

A C1orf124/Spartan szerepe a DNS-hiba tolerancia útvonalban

PhD értekezés

Írta: Juhász Szilvia

Témavezető: Dr. Haracska Lajos

**Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet**

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola
2012**

Tartalomjegyzék

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
II. IRODALMI BEVEZETŐ	4
II/1. A DNS károsodások következményei	4
II/2. A DNS-hiba javító mechanizmusok felfedezése.....	4
II/3. A DNS károsodások típusai.....	6
II/4. A DNS-hiba javító folyamatok csoportosítása	7
II/4.1. A DNS-hiba kivágó mechanizmusok	7
II/4.2. A mismatch javító mechanizmusok	8
II/4.3. A DNS kettősszálú töréseket javító mechanizmusok	9
II/4.4. A DNS szálak közötti keresztkötéseket javító mechanizmusok.....	10
II/4.5. A DNS-hiba tolerancia útvonal	10
II/4.5.1. Az ubikvitiláció folyamata.....	10
II/4.5.2. A PCNA szerepe a DNS-hiba tolerancia útvonalban	12
II/4.5.3. Az emberi Rad18 fehérje	13
II/4.5.4. A PCNA mono-és poliubikvitilálásnak szerepe.....	14
II/4.5.5. A DNS-hiba tolerancia szabályozása	16
II/5. Az ubikvitin kötő domének szerepe a DNS-hiba javításban	17
II/5.1. Az emberi SNM1A fehérje	18
III. CÉLKITŰZÉS	20
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
IV/1. Oldatok és pufferek	21
IV/2. A kísérlet során használt plazmid konstrukciók.....	21
IV/3. A fehérjék tisztítása in vitro kísérletekhez.....	22
IV/3.1. A His-ubikvitin tisztítása	22
IV/3.2. Az emberi Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13, RFC, UBA1 és HLT fehérjék tisztítása	22
IV/3.3. A Spartan tisztítása	23
IV/4. GST pull-down kísérlet.....	24
IV/5. In vitro deubikvitilációs kísérlet.....	24
IV/6. A sejtek immunfestése.....	24
IV/7. A használt sejt kultúrák, lokalizációs vizsgálatok.....	25

IV/8. Felhasznált siRNS-k	25
IV/9. A stabil sejtvonalak készítése.....	26
IV/10. Áramlási citométer alapú sejtérzékenységi teszt.....	27
IV/11. Komplementációs analízis sejt érzékenységi tesztben.....	27
IV/12. Immunoprecipitáció	27
IV/13. Testvér kromatidák közötti kicserélődés vizsgálata (SCE analysis)	28
V. EREDMÉNYEK	29
V/1. A C1orf124 azonosítása és a szerkezete	29
V/2. A Spartan a DNS károsodás helyéhez lokalizál	32
V/3. A Spartan lokalizációja függ a PIP és UBZ doménjétől.....	36
V/4. A Spartan lokalizációja függ a Rad18-tól	37
V/5. A Spartan egy fehérje komplexben működik a Rad18-al	40
V/6. A Spartan lokalizációja függ az ubikvitin-PCNA-tól	41
V/7. A Spartan egy fehérje komplexben működik az ubikvitin-PCNA-vel	43
V/8. A Spartan közvetlen köti az ubikvitin-PCNA-t in vitro körülmények között.....	45
V/9. A Spartan csendesített emberi sejtek érzékenységet mutatnak DNS károsító ágensekkel szemben	48
V/10. A Spartan csendesítése fokozza a testvér kromatidák közötti átkereszteződések számát	50
V/11. A Spartan stimulálja a pol η replikációs villához történő lokalizációját.	52
V/12. A Spartan gátolja az USP1 TLS gátló hatását.	54
V/13. A Spartan gátolja az ubikvitin-PCNA-n az USP1 függő deubikvitilációját <i>in vivo</i> körülmények között	56
V/14. A Spartan gátolja az USP1/UAF1 függő PCNA deubikvitilációt <i>in vitro</i> körülmények között.	58
VI. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	60
VII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	65
VIII. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	67
IX. SUMMARY OF THE PHD THESIS (ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ)	70
X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	73
XI. REFERENCIÁK	74

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

UV	Ultraviola (Ultraviolet)
MMS	Metil-metán-szulfonát (Methyl methanesulfonate)
BER	bázis kivágó hibajavítás (Base Excision Repair)
NER	nukleotid kivágó hibajavítás (Nucleotid Excision Repair)
PCNA	a replikatív polimeráz processzivitási faktora (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
DSBR	DNS kettősszálú töréseket javító mechanizmus (DNA Double Strand Break Repair)
HR	homológ rekombináció (Homologous Recombination)
NHEJ	a nem homológ végeket összekapcsoló mechanizmus (Non Homologous End Joining)
HJ	Holliday junction struktúra
TLS	transzléziós DNS-szintézis (Translesion DNA Synthesis)
E2	ubikvitin konjugáló enzim
E3	ubikvitin ligáz enzim
RFC	replikációs faktor (Replication Factor C)
USP1	ubikvitin specifikus proteáz enzim (Ubiquitin Specific Protease1)
UAF1	USP1 kötő fehérje (USP1-associated factor1)
UBZ	ubikvitin kötő domén (Ubiquitin Binding Zinc Finger)
C2HC	C2HC konszenzus szenkvenciával rendelkező UBZ domén
PIP	PCNA kötő motívum (PCNA Interacting Motif)
BrdU	Bromodoexyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine)
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
SCE	Testvér kromatidák közötti kicserélődés (Sister Chromatid Exchange)

II. IRODALMI BEVEZETŐ

II/1. A DNS károsodások következményei

A biológiai információ átadását generációról generációra az örökítőanyag teszi lehetővé. A sejtek örökítőanyagát azonban folyamatosan érik külső és belső forrásokból származó károsító hatások, amelyek meg tudják változtatni annak kémiai szerkezetét. Ezek a károsító tényezők mutációkat, genomikus instabilitást, és végső soron a sejtek rákos elfajulását vagy akár halálát is okozhatják. Az élő sejtek számára ezért létfontosságú a DNS károsodások felismerése és javítása. Az evolúció során a DNS hibák javítására sokféle folyamat alakult ki (1-4). Mind a prokarióták, mind az eukarióták rendelkeznek hibajavító apparátussal a túlélés érdekében. A DNS-hiba javító rendszerek pontos működéséhez számos fehérje összehangolása szükséges szabályozó folyamatokon keresztül. Hiányos működésük súlyos megbetegedések kialakulásához vezethet, ilyen például a Xeroderma Pigmentosum (5) vagy a Werner-szindróma (6). Ezek a genetikai rendellenességek napjainkban még gyógyíthatatlan betegségnek számítanak, amely számos kutató laboratóriumot sarkal a DNS-hiba javító folyamatok molekuláris hátterének vizsgálatára.

II/2. A DNS-hiba javító mechanizmusok felfedezése

A sejteknek azt a képességét, hogy a nagy dózisu UV sugárzás után is képesek felépülni, először az 1930-as évek közepén figyelték meg. A DNS-hiba javító mechanizmusok felfedezésére viszont az 1940-es évek végéig várni kellett. Ezt egymástól függetlenül két kutató tette meg: Cold Spring Harbor-ban, Milislav Demerec csoportjában dolgozó Albert Kelner, valamint a University of India-ban Salvador Luria csoportjában dolgozó Renato Dulbecco. Mindketten UV sugárzást használtak és rendellenes túlélési arányokat figyeltek meg, amikor sejteket vagy bakteriofágokat hosszú hullámú sugárzással, napsugárzással, vagy fluoreszcens fénnyel világítottak meg. Ezek a megfigyelések vezettek ahhoz a felfedezéshez, hogy UV fény hatására a DNS-ben kialakuló ciklobután-pirimidin dimerek visszaalakulnak monomerekké egy látható fény indukálta folyamatnak köszönhetően, amelyet enzimátikus fotoreaktivációnak neveznek (7).

Richard Setlow azonosította a timin dimereket, amelyek a DNS struktúrájában nagy változásokat eredményeznek, és akkor keletkeznek, ha a sejtet UV fény éri. Ezen DNS-hibák javítását mutatta be kísérletesen Setlow az 1960-as évek közepén, amely a DNS-hiba kivágó

mechanizmus segítségével megy végbe (8). Tomas Lindahl mutatta ki, hogy míg a pirimidin dimerek nukleotid kivágó folyamattal kerülnek javításra, addig az uracilt a bázis kivágó mechanizmus javítja (9). Így az 1970-es években vált a tudósok számára egyértelművé, hogy nagyon sokféle DNS károsodás létezik, és nem csak egy javító folyamatot kell számolni, hanem feltehetően számos új mechanizmus vár még felfedezésre.

Dick Setlow és munkatársai kísérletesen bizonyították a kivágó folyamatok másik típusát, a mismatch mechanizmust. Ehhez a javításhoz szükséges, hogy a sejt különbséget tudjon tenni az anyai és újonnan szintetizált szálak között. Matthew Meselson kísérletesen kimutatta, hogy a szülői szálon GATC szekvencián az adenin metilálva van. Paul Modrich és kollégái írták le, hogy a mismatch repair valóban GATC metiláció függő baktériumban (10). Az 1970-es években Philip Hanawalt és munkatársai írták le, hogy létezik egy transzkripció kapcsolt javítás, amelyik az újonnan szintetizált szálon működik a transzkripciósan aktív géneken (11).

Annak ellenére, hogy ezek a mechanizmusok folyamatosan javítják a hibákat, mégis maradhatnak károsodott DNS-régiók a sejtben. Ezen hibák blokkolhatják a replikációt, amely a sejt pusztulását okozhatja. Ennek elkerülésére alakult ki a DNS-hiba tolerancia, amely segít a sejteknek túlélni a replikáció megállásának halálos kimenetelét ameddig a hiba sikeresen eltávolításra nem kerül. A DNS-hiba tolerancia megértésének úttörő elmélete volt az SOS-hipotézis, amelyet Miroslav Radman alkotott meg az 1970-es évek közepén. Az elmélet azt mondja ki, hogy az *E. coli*-ban léteznek olyan javító mechanizmusok, amelyek normál körülmények között represszálva vannak, viszont DNS károsodás hatására a javításban szerepet játszó gének transzkripciója aktiválódik. Egyik ilyen lehetséges indukciót kiváltó tényező a normál DNS replikáció leállása lehet. Megfigyelte azt is, hogy az SOS reparáció működése során a mutációs ráta megnövekszik. Harrison Echols *E. coli*-ban egy modellt állított fel, miszerint ha a DNS replikáció megáll, akkor az SOS szabályozta gének által kódolt fehérjék kölcsönhatnak a megállt replikációs villánál, elősegítve annak tovább haladását. Az 1980-es évek végén, valamint az 1990-es évek elején vált nyilvánvalóvá, hogy az Echols-hipotézisében szereplő fehérjék valójában alacsony pontossággal működő DNS polimerázok, az általuk végzett folyamatot transzléziós DNS-szintézisnek nevezték el. Ezek alacsony átírási hűsége engedi meg a replikáció hibán történő áthaladását, a helytelen bázisok beépülésének nagy valószínűségével. Az elmúlt évtizedben fedezték fel, hogy eukariótákban és magasabb rendű organizmusokban több ilyen specializált DNS polimeráz létezik (1,12).

II/3. A DNS károsodások típusai

A DNS-ben a legérzékenyebb kémiai kötés a bázisok és a dezoxiribóz közötti glükozidos kötés, amely megszűnése esetén, a purin vagy pirimidin bázisok elvesztésekor abázikus hely keletkezik (13). Az abázikus helyeken a replikatív polimeráz megáll és nem képes folytatni a DNS szintézisét. Humán szövettenyészetből kimutatták, hogy naponta akár 10000 abázikus hely is képződhet.

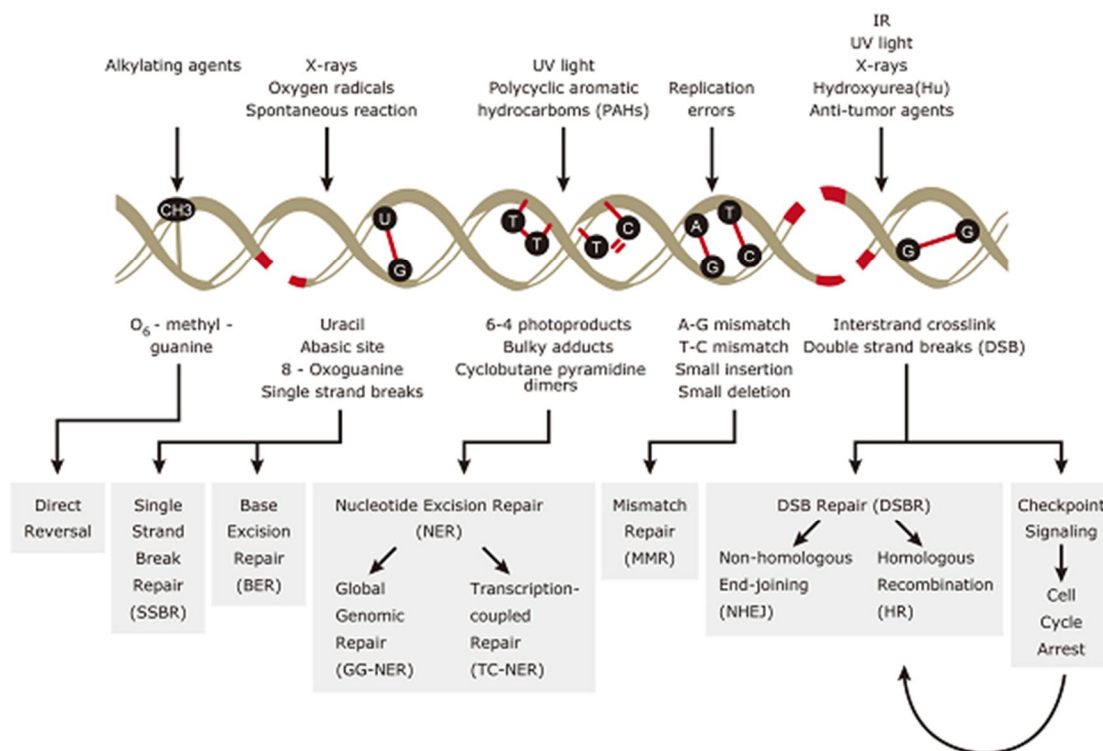
A DNS szerkezetében különböző súlyos sérüléseket képesek kiváltani a különféle mutagén hatású vegyületek, mint a bázisokat alkiláló, deamináló, oxidáló és interkaláló vegyületek. Deamináció esetén a bázisok viszonylag instabil amino-csoportja keto-csoporttá alakul át. Ilyen módosulás az adenin hypoxantinná, a guanin xantinná, és az 5-metil-citozin timinné alakulása(14). Az oxidatív metabolikus folyamatok során képződő melléktermékek képesek reaktív oxigéngyökök, mint a peroxid, szuperoxid és hidroxil gyökök kialakulását eredményezni. A reaktív oxigéngyökök jelenlétének következtében száltörések vagy bázismódosulások alakulhatnak ki. Utóbbiak hatására GC-TA transzverzió jöhet létre a replikációt követően, amely a Watson Crick szabályoktól eltérő párosodást okoz, ezáltal növelve a genomikus instabilitás kialakulásának esélyét(15). A normál metabolizmus esetén is bekövetkezhet naponta akár 1000 bázis alkiláció, ilyen módosulások közé soroljuk a bázisok metilációját, mint az adenin 3-metil-adeninné történő alakulását(16).

A nukleinsav bázisok által elnyelt UV sugárzás leggyakrabban ciklobután-pirimidin, és pirimidin-pirimidin dimerek kialakulását okozza, amely a legtöbb esetben T-T, kisebb számban T-C illetve C-C kovalens kapcsolatokat jelent, amely az egyik bázis 6-os, és a szomszédos bázis 4-es pozíciójában található szén atomjai között alakul ki (17). Az ilyen típusú károsodások is képesek meggátolni a replikációs apparátus haladását a DNS-szálon.

A DNS-hibák forrása lehet akár maga a replikációs apparátus is. A mechanizmusban részt vevő enzimek olykor nem megfelelő hatékonysággal működnek. Ilyenkor úgynevezett „mismatch” szekvenciák jöhetnek létre.(18)

Különböző keresztkötések jöhetnek létre a DNS szálak között vagy akár a DNS és fehérje között, UV és más ionizáló sugárzás hatására (19). Ezen kívül a DNS-ben akár egyesszálú illetve kettősszálú törések is létrejöhetnek ionizáló sugárzások vagy akár normál metabolizmus következtében is.

A DNS károsodások különböző fajtainak javítására a DNS-hiba javító folyamatok változatos típusai specializálódtak (1. ábra).



1. ábra: A DNS károsodások típusai (GeneTex)

II/4 A DNS-hiba javító folyamatok csoportosítása

II/4.1. A DNS-hiba kivágó mechanizmusok

A DNS-hiba kivágó rendszerek működésekor a károsodást tartalmazó rövid DNS szakaszt egy endonukleáz eltávolítja. Ha a hiba csak az egyik szálon van jelen, a templát szálról lehetőség nyílik a hiányzó komplementer szekvencia pontos szintézisére.

A *bázis kivágó hibajavítás* (Basis Excision Repair, BER) specifikus glikozilázokat igényel a bázisok kovalensen módosult vagy sérült formáinak felismeréséhez és eltávolításához. A DNS szálon csúszva a kis árok mentén keresik a hibát. Az N-glikozidos kötést hidrolizálják a glükóz és a módosult bázis között. Így egy apurin vagy apirimidin hely keletkezik. Ezután a hibás bázis eltávolítása következik egy AP endonukleáz által. A kialakult egy nukleotid hosszúságú rést a templát szál alapján DNS polimeráz tölti fel és ligáz állítja vissza a DNS folytonosságát (20).

A nukleotid kivágó hibajavítás (Nucleotid Excision Repair, NER) bázis kivágó rendszerrel ellentétben nem a bázisok specifikus kémiai módosítását, hanem a kettősszálú hélixben lévő torzulást ismeri fel. Így a BER által nem észlelt hibák sem maradnak észrevétlenül a DNS szálban. A nukleotid kivágó hibajavítás minden organizmusban hasonló folyamat révén játszódik le. A hiba felismerése után egy multi-protein komplex köt a DNS szálhoz. A komplexben lévő nukleázok a hibától meghatározott távolságra két irányban a hibát tartalmazó DNS szálát átvágják, a köztes egyszálú DNS-t egy helikáz pedig eltávolítja. A bemetszések között kialakult egyszálú régiót egy DNS polimeráz tölti fel és ligáz állítja vissza a DNS folytonosságát (21).

II/4.2. A mismatch javító mechanizmus

A mismatch javítómechanizmus a nem megfelelően párosodott nukleotidok (mismatch) javítását végzi. A replikáció során előfordulhat, hogy a replikatív polimeráz proofreading aktivitása nem tökéletes és egy inkorrekt bázispár keletkezik. Ilyen esetben egy rövid ideig még lehetőség van a hiba javítására. A mismatch repair akár két vagy három nagyságrenddel növeli a replikáció pontosságát, azaz minden századik vagy ezredik hiba marad csak meg.

A sejtnek azonban fel kell ismernie melyik az újonnan keletkezett hibás és melyik az eredeti szál, ami a hemimetilált régiók felismerésével lehetséges. Replikáció során nem metilált helyek keletkeznek, ahol az új szálon a szekvencia még néhány percig nincs metilálva. E.coliban intenzíven tanulmányozták ezt a rendszert. Intenzív kutatások után az E. coliban felfedezték a MutS, MutL és MutH fehérjét. Leírták, hogy a MutS ismeri fel és köti a hibás bázis párosodás miatt torzult DNS szakaszt.

Az eukarióta sejtekben szintén működik a mismatch javítás. A MutS fehérje homológja az MLH. Több humán MLH fehérjét is azonosítottak. Ezek mutációja daganatos megbetegedések oka lehet. (pl.MSH2 és MSL) Érdekes módon az eukariótákból hiányzik a Dam metiláz és a MutH homológja. Az új szál felismerését tehát nem a specifikus metilált szekvenciák teszik lehetővé, hanem az Okazaki fragmentek között elhelyezkedő nickek. Ebből következik, hogy csak addig tud működni a rendszer, amíg a ligálás be nem következik (22).

II/4. 3. A DNS kettősszálú töréseket javító mechanizmusok

Az osztódó sejtekre nézve különösen veszélyes az olyan DNS-károsodás, amikor a kettős hélix mindkét szála eltörik. A DNS kettősszálú töréseket javító mechanizmusokat összefoglaló néven DNS kettősszálú töréseket javító mechanizmusoknak (DSBR, DNA Double Strand Break Repair) nevezzük. Ezen belül két fő útvonalat különíthetünk el. A homológ rekombinációs javító mechanizmust (HR Homologous Recombination), amely a javítást a törés környezetével homológ régióról végzi, azaz a testvér kromatid segítségével. A másik a nem homológ végek random összekapcsolásával (NHEJ Non Homologous End Joining) távolítja el a DNS kettősszálú törést, amelynek következtében deléciók és transzlokációk jöhetnek létre. A homológ rekombinációs hibajavítás és a NHEJ aránya meghatározó lehet, hiszen a NHEJ túlsúlya a sejtben további hibákat generálhat, aminek következtében súlyos betegségek alakulhatnak ki (23).

A DNS kettősszálú törésekor a szabad DNS végeket az MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) komplex stabilizálja. Innen elindulhat a HR folyamata, illetve a sejt választhatja a NHEJ utat is.

A HR esetén az 5' véget az MRXN komplexben lévő Mre11 nukleáz visszaemészt (24). A keletkező 3' túlnyúló DNS szálhoz RPA ssDNS védőfehérjék kötődnek, és a Rad51 és a Rad52 fehérjék érkeznek a DSB helyéhez, amelyek az RPA disszociációját követően kötődnek a DNS szálhoz. A dinamikus struktúrához további fehérjék kapcsolódnak, mint például BRCA1, amelynek hibás működése rákos elfajuláshoz vezethet (24,25). A törés helyénél kialakult fehérje komplex hozza létre a preszinaptikus filamentet, amely a szálinváziót indukálja, aminek következtében kialakul a D loop struktúra. A DNS törésnél a hiányzó szekvenciát egy DNS polimeráz pótolja. A DNS szintézis után a filament fehérjéi feleslegessé válnak, ezeket a RecQ és BLM helikázok távolítják el. A D-loop kiterjedése által két Holliday junction struktúra (HJ) keletkezik a DNS-en. A RecQ és BLM helikázok a keresztszálvándorlást is serkenti. A HJ feloldása több úton történhet. Az egyik útvonal nem eredményez rekombinációt, a másik folyamatban történhet átkereszteződés (26,27).

A NHEJ esetén az MRN komplex által stabilizált kettősszálú DNS végekhez a Ku70/Ku80 heterodimer kapcsolódik. A kialakult komplex védelmet nyújt a nukleázokkal szemben és stimulálja a DNS PKcs kötődését. A komplex további fehérjékkel lép kapcsolatba, mint az Artemis kináz, amely foszforilálódik, majd a LigázIV és kofaktorai a Lif1 és XRCC4. Ez a komplex valamint a NHEJ processzivitási faktor random összekapcsol két véget, amelynek következtében akár genomikus átrendeződések is létrejöhetnek (28,29).

II/4.4. A DNS szálak közötti keresztkötéseket javító mechanizmusok

Emlős sejtekben a bázisok közötti kovalens keresztkötések (ICLs, interstrand crosslinks) képesek a replikációs apparátust megállítani, és akár DNS kettősszálú törést okozni. A DNS keresztkötések feloldását több javító mechanizmus együttműködése eredményezi. Először a nukleotid kivágó mechanizmus aktiválódik a sérült szakasz felismerésével, majd nukleáz aktivitással rendelkező fehérjék eltávolítják a sérült DNS szakaszt, mint a Mus81-EME1, XPF-ERCC1, SLX1-SLX4 és FAN1. (30) A folyamat szabályozása a résztvevő fehérjék ubiquitilációjával történik. A folyamat következtében kialakuló DNS „rések” feltöltését alternatív polimerázok végzik (TLS) homológ rekombináció vagy NHEJ. A javító mechanizmus eredményeként a replikáció folytatódhat.

A Fanconi anémia (FA) útvonalba tartozó gének közül a FANCA/B/C/E/F/G/L/M vesz részt a FA core complex kialakításában, és aktiválják a FANCD2 és FANCI monoubiquitilációját, amelyet a FANCL ubiquitin ligáz és az UBE2T ubiquitin konjugáló enzimek katalizálnak. A folyamat további fehérjék kötését eredményezi az FA komplexhez, mint a FANCD/J/N/O/P. Ennek következtében a FAAP24 (FA-associated protein 24 kDa) fehérje kapcsolódik a komplexhez, majd a struktúra specifikus endonukleázok (például XPF-ERCC1) is kötődnek. Kimutatták, hogy ebben az útvonalban a FANCM-FAAP24 komplex további funkciókkal rendelkezik, ilyen a DNS keresztkötés felismerése a mismatch fehérjékkel együtt, a megállt replikációs villa stabilizálása és az ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related) függő ellenőrző szignál aktiválása. A FANCM stabilitásáért az MHF1 és MHF2 fehérjék felelősek (31).

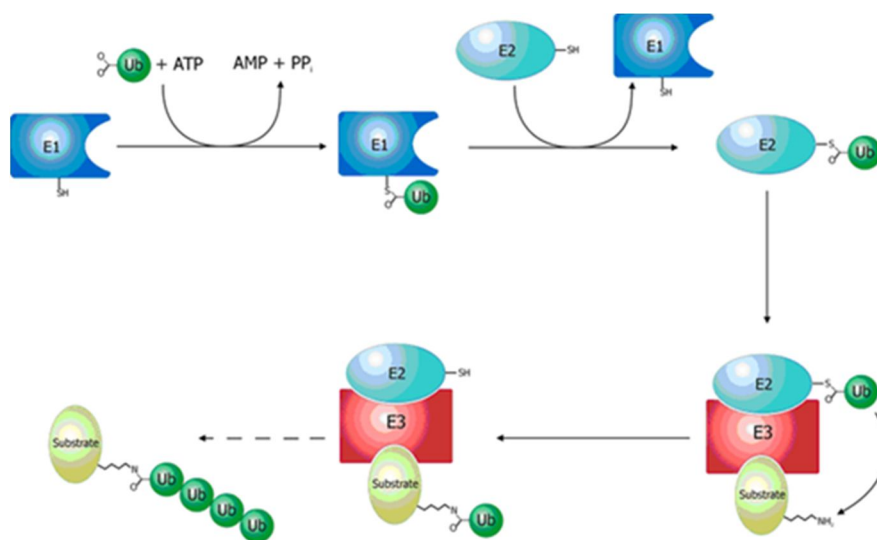
Az endonukleázok működésének következtében kialakult szabad DNS végek aktiválják vagy a Rad51 függő HR-t, vagy a NHEJ-t vagy a TLS-t (Transzléziós DNS-szintézis). Működésük eredményeként pótolják a hiányzó DNS szekvenciát.

II/4.5 A DNS-hiba tolerancia útvonal

II/4.5.1. Az ubiquitiláció folyamata

A DNS károsodások folyamatos javítása mellett mégis előfordulnak olyan esetek, amikor a DNS károsodások a DNS szálon maradnak és a sejt belép a sejtciklus replikáció fázisába. Ebben az esetben a javítatlan hibák a replikációs villa megállását okozhatják. A replikatív polimeráz aktív centruma csak a hibátlan DNS szálát képes befogadni. Amennyiben ez nem

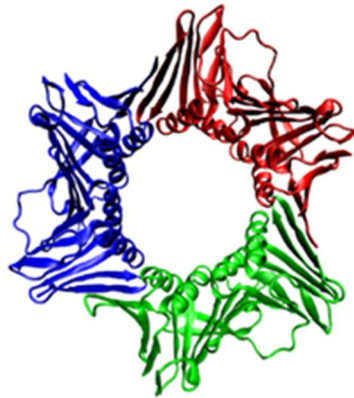
lehetséges a DNS polimerizáció leáll, DNS kettősszálú törés alakulhat ki, amely a DSB javító mechanizmust aktiválhatja, amelyek túlműködése azonban genomikus instabilitáshoz vezethet. A DNS kettősszálú törések illetve a genom instabilitásának elkerülésére, összefoglalva az elakadt replikációs villa mentésére alakultak ki a DNS-hiba tolerancia útvonalak (DNA damage bypass repair DDR) (32). Ennek a rendszernek köszönhetően a replikáció tovább halad, a DNS-hiba tolerálása vagy javítása mellett. Az eukarióta hiba tolerancia útvonalakat elsőként péklesztőben tanulmányozták (33-35), és kiderült, hogy konzervált mechanizmus révén az emberben is hasonlóan működik. A genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az útvonal szabályozásában meghatározó szerepe van az ubikvitilációnak. Az ubikvitin egy 76 aminosavból álló konzervált jelmolekula. Az ubikvitilációs folyamatban résztvevő enzimek az E1, amely az ubikvitin aktiválásáért felelős, az E2 ubikvitin konjugáló enzim, az E3 ubikvitin ligáz, amelyek együttműködve az adott szubsztrátra helyezik az ubikvitin molekulát. Az E1 enzimről jelenleg emberi sejtekben kettőt, az E2 enzimről tízet, E3 enzimről több százat ismerünk (2. ábra).



2. ábra: Az ubikvitiláció mechanizmusa (WIREsRNA)

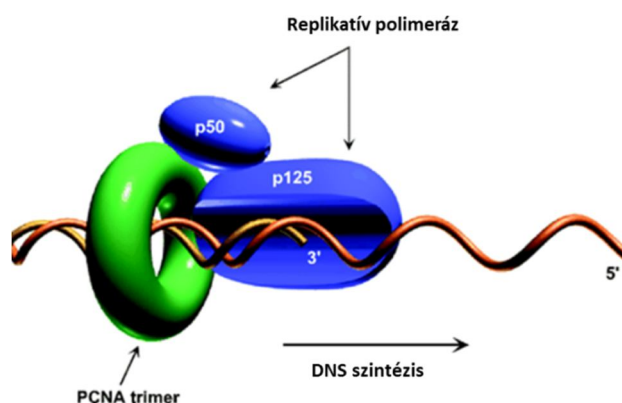
II/4.5.2. A PCNA szerepe a DNS-hiba tolerancia útvonalban

A DNS-hiba tolerancia útvonalban központi szerepe van a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) molekulának a ubiquitilációjának. A PCNA molekula három alegységből épül fel, funkcionálisan homotrimer gyűrűt alkot a DNS-en (3. ábra).



3. ábra: A PCNA 3 dimenziós modellje

A PCNA-t a replikatív polimeráz processzivitási faktoraként írták le, de ma már tudjuk, hogy DNS károsodás hatására az úgynevezett transzléziós polimerázok működését is segíti. A sejt normál replikációja során az RFC (replikációs faktor C) ATP segítségével a PCNA-t a DNS szálra helyezi. A replikatív polimerázok (polimeráz delta, polimeráz epsilon) képesek kötődni a DNS szál körülfutó PCNA molekula C-terminális részéhez. Az így létrejött interakció megnöveli a polimerázok stabilitását, a PCNA a DNS szálon csúszva fejti ki a polimeráz haladását segítő aktivitását (4. ábra).



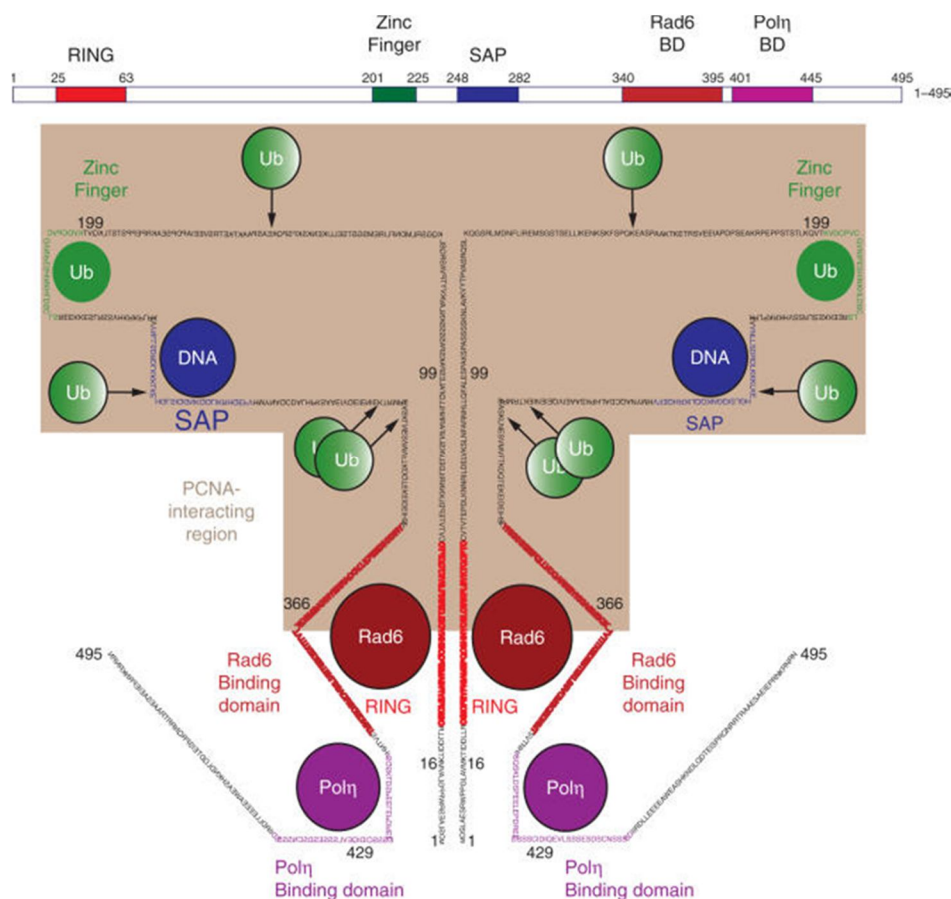
4. ábra: A PCNA szerepe normál replikáció esetén(36)

(A replikatív polimeráz alegységei: p50, p125)

A PCNA ubikvitilációját a Rad6-Rad18 csoport tagjai végzik. A Rad6 fehérje ubikvitin konjugáló enzimeként (E2) funkcionál, az aktivált ubikvitint megköti, és a Rad18 ubikvitin ligázzal (E3) a szubsztrátra, jelen esetben a PCNA 164-es pozícióban lévő lizinjére helyezi(37-40). A PCNA molekula ubikvitilációja aktiválja a DNS-hiba tolerancia útvonal egyes alútvonalait.

II/4.5.3. Az emberi Rad18 fehérje

A Rad18 ubikvitin ligáz (E3) fehérje, a Rad6 ubikvitin konjugáló (E2) enzimmel együtt fontos szerepet tölt be a DNS-hiba tolerancia útvonalban. A Rad18 fehérje a következő doméneket hordozza, mint a RING (ligáz aktivitás), UBZ (ubikvitin kötés), SAP (DNS kötés) és a Rad6-kötő (Rad6-binding domain, R6BD) (41). A RING domén szükséges az E2 enzim megkötéséhez, és az R6BD segítségével olyan hármas komplex alakul ki, amelyben két Rad18 kötődik egy Rad6 molekulához. Ez a komplex végzi a PCNA monoubikvitilációját. Kísérletekben azt mutatták ki, hogy a DNS kötéséért a SAP domén felelős, de nem szükséges a Rad18 DNS károsodás helyéhez történő lokalizációjához. Az N-terminális közelében található a C2HC Zn finger domén (UBZ domén), amely az ubikvitin kötéséért felelős (5. ábra), ha mutációt szenved, akkor elmarad a Rad18 replikációs villához történő lokalizációja. A Rad18 C-terminálisán egy Pol η kötő domént hordoz, amelynek szerepe a replikációs villa megállításában és a Rad18-Pol η sejtmagi lokalizációjában lehet.



5. ábra: Az ember Rad18 fehérje domén szerkezete(42)

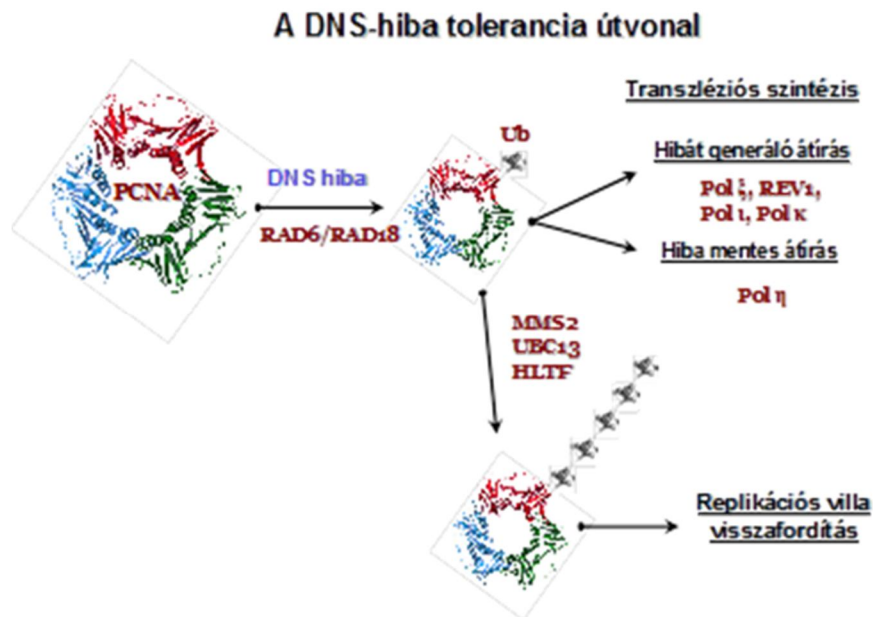
Kimutatták, hogy a Rad18 kölcsönhat az RPA (Replication protein A) fehérjével, amely a kialakult fehérje komplexet a sérült DNS régióhoz irányítja. Ezzel is elősegíti a PCNA DNS károsodás indukálta ubikvitilációját. Kísérleti adatok azt mutatják, hogy a PCNA molekula csak a DNS szálon képes ubikvitilálódni. Igazolták, hogy Rad18 által K164-es pozícióban monoubikvitilált PCNA molekulával számos olyan fehérje kölcsönhat, amely a DNS-hiba javító útvonalakban aktív. Interakciós partnereként írták le az SNM1A , WRNIP1, a polη és polι molekulákat is.

II/4.5.4. A PCNA mono- illetve poliubikvitilációjának szerepe

A DNS-károsodás következtében megállt replikációs villa helyénél a Rad6-Rad18 ubikvitin konjugáló és ligáz enzim komplex képes monoubikvitilálni a PCNA-t. Monoubikvitiláció esetén a replikatív polimeráz lecserélődik egy úgynevezett alternatív polimerázra, amelynek aktív centruma képes befogadni a beépült hibás bázist. A DNS-hibán túlhaladva pár ismét

visszacserélődik a replikatív polimeráz, és helyreáll a sejt normál replikációja. Ez a folyamat a transzléziós szintézis (TLS Translesion synthesis). A TLS folyamata a DNS hiba típusától is függően különböző alútvonalra tagolódik (13,43,44). Az egyik út a polimeráz éta (Pol η) aktiválásával az UV-károsodott DNS hiba mentes átírását biztosítja, míg más útvonalakban, a polimeráz kappa (Pol κ), polimeráz iota (Pol ι), polimeráz zéta (Pol ζ) és Rev1 játszik főszerepet. A Pol η , ι és κ PCNA kötő (PIP, PCNA Interacting Motif) motívumán keresztül képes interakcióba lépni a PCNA-vel. Számos tanulmány kimutatta, hogy a PIP domén szükséges a polimeráz TLS-ben betöltött szerepének ellátásához is. Az Y családbeli TLS polimerázok a monoubikvitalált PCNA-hez ubikvitin kötő motívumain keresztül kapcsolódnak. Ez a Pol η és a Pol κ esetében az UBZ (Ubiquitin Binding Zinc Finger), míg a Pol ι és REV1 esetén UBM (Ubiquitin Binding Motif) motívum (45-48) (49).

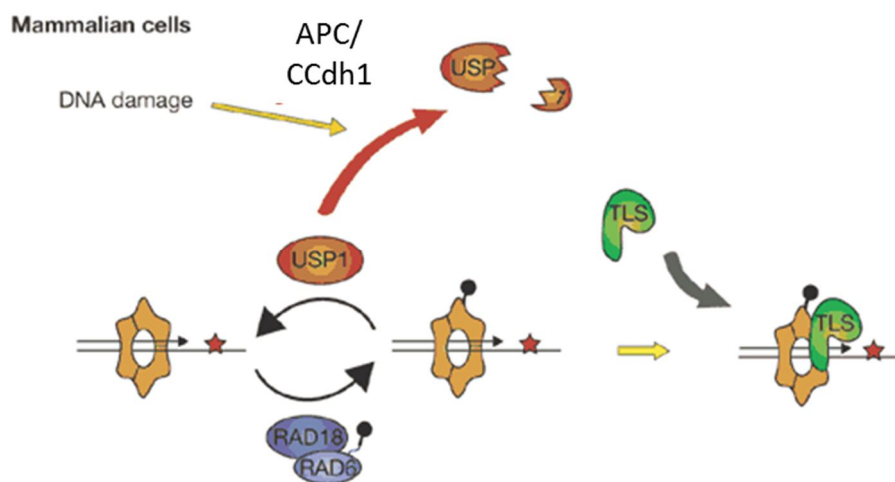
A Rad6-Rad18 mellett az emberi HLTF (Helicase like transcription factor) fehérje is rendelkezik ubikvitin ligáz aktivitással, amely az Ubc13-Mms2 ubikvitin konjugáló enzim komplexel együtt képes a már monoubikvitalált PCNA-re további ubikvitin molekulákat kapcsolni. Az így létrejött poliubikvitin lánc nem a proteolitikus degradációra kijelölt fehérjék esetén megszokott K48-as elágazású lánc, hanem az ubikvitin K63 aminosaván helyezkedik el. Laboratóriumunkban kimutatták, hogy HLTF (élesztőben Rad5) fehérje ATP-áz és helikáz domének segítségével, valamint a kettősszalú DNS transzlokáz aktivitásának köszönhetően képes a sérült bázist tartalmazó szakaszon visszafordítani a replikációs villát, úgynevezett "csirkeláb" struktúrát formálva abból. A modell szerint a vezető szálon lévő hiba esetén a replikáció leállása után a vezető és a lemaradó szál szintézise szétkapcsolódik, majd a Rad5/HLTF az újonnan keletkezett szálakat letekeri, egymással hibridizáltatja. A hibával szemben lévő szál replikációja a már újonnan megszintetizált testvér kromatidáról történik. Az átírás után a Holliday junction jellegű struktúra feloldódik, a replikációs villa visszaáll, és a replikáció zavartalanul haladhat tovább (6. ábra). (50,51)



6. ábra: A DNS károsodás következtében megállt replikációs villa mentése a Rad6-rad18 csoport tagjainak közre működésével

II/4.5.5. A DNS-hiba tolerancia útvonal szabályozása

A PCNA ubikvitilációjának szabályozása azt is meghatározza, hogy a DNS károsodás következtében elakadt replikációs villa mentése rekombináció függő módon vagy a Rad18 csoport tagjainak működésével következik be. Az ubikvitilált (mono-és poliubikvitin) PCNA féléletidejét képes szabályozni az USP1 fehérje (Ubiquitin-specific protease 1) együtt működve az UAF1 fehérjével (USP1-associated factor 1). Az USP1 az UAF1 fehérjével alkotott komplex katalitikus alegysége, amely eredményeként képesek deubikvitilálni a PCNA molekulát, ezzel akadályozni a DNS-hiba tolerancia útvonal működését, utat engedve a rekombináció függő replikációs mentésnek. Az ELG1 PCNA-vel kölcsönható fehérje szükséges az USP1-UAF1 replikációs villához történő toborzásához(52). Az USP1 függő PCNA deubikvitiláció a sejtciklus szabályozása alatt áll. Az APC/CCdh1 (anaphase-promoting complex/cyclosome(Cdh1)) komplex ubikvitin ligáz aktivitása által képes ubikvitin láncot kapcsolni az USP1 fehérjére UV károsodás hatására, amelynek következtében az USP1 proteolitikus hasítása következik be. Így utat enged a DNS-hiba javító folyamatoknak (7. ábra)(53-57).



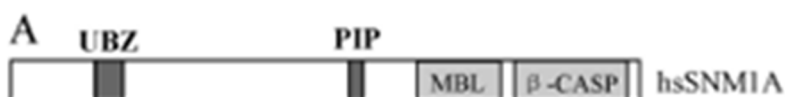
7. ábra: Az USP1 működésének modellje(58)

II/5. Az ubikvitin kötő domén szerepe a DNS-hiba javító fehérjékben

A DNS-hiba javító folyamatok többségének a szabályozásához elengedhetetlen bizonyos fehérjék ubikvitin módosítása, amelyek aktiválják vagy inaktíválják ezeket a mechanizmusokat (59-61). Az ubikvitin szignál felismerésére többféle fehérje domén is kialakult az evolúció során, amelyek a következő csoportokba oszthatók az ubikvitin kötő doménszerkezetek alapján. Ilyen ubikvitin kötő domén az UBM (Ubiquitin Binding Motif) és az UBZ (Ubiquitin Binding Zinc Finger) (62), amelyek targetként ismerik fel az ubikvitilált komplexeket. Az ubikvitin kötő motívum (UBM) például a polimeráz iota-ban és a Rev 1 polimerázokban található meg. Az ubikvitin kötő cink finger (UBZ) domén a nevét jellegzetes cinkujj-szerű struktúrájáról kapta. Az UBZ doménnek két altípusa van. Az egyik konszenzus szekvenciája a C2H2, amely megtalálható az alternatív (transzléziós TLS) polimerázok Y családjába tartozó pol η fehérjében. A C2H2 alfa helikális motívumokat alkot, amelyek között elhelyezkedő hidrofób aminosavakhoz kötődik az ubikvitin molekula. A polimeráz éta UBZ doménje klasszikus cinkujj szerkezetet mutat, $\beta\beta\alpha$ formát vesz fel. Az ubikvitin kötő cink finger domén másik csoportjára a C2HC konzervált szekvencia jellemző. Ilyen jellegű cinkujj-szerű domén található például a Rad18 és SNM1A fehérjékben, valamint az általunk vizsgált fehérjében is (63).

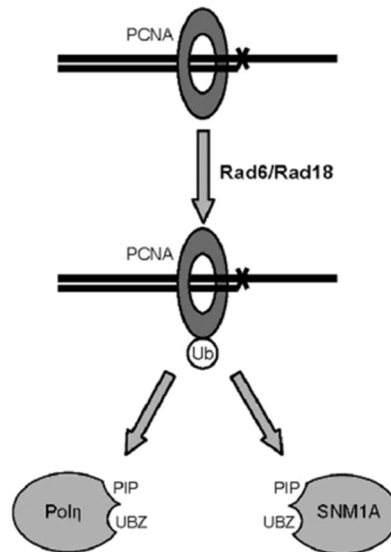
II/5. 1. Az emberi SNM1A fehérje

AZ SNM1A fehérje az SNM1 nukleázok családjába tartozik. A különböző DNS szálak közötti keresztkötések feloldásában játszik fő szerepet. A keresztkötés a DNS-ben az egyes szálakon belül, a szálak között, valamint a DNS és fehérjék között is létrejöhet. Ezeket különböző károsító ágensek okozzák. A DNS szálak közötti keresztkötéseket (interstrand crosslinks, ICLs) emlős sejtekben a már ismert mechanizmusok együtműködve javítják. (NER, HR, TLS). A 8. ábra az SNM1A szerkezetét mutatja be(64,65).



8. ábra:Az SNM1A fehérje doménszerkezete(65)

Az SNM1A molekula DNS károsodás hatására sejtmagi fókuszokat alkot, kijelölve a károsodás helyét, amely lokalizációt a Rad18 szabályoz. Kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között DNS exonukleáz aktivitása által képes feloldani a létrejött keresztkötéseket. A legújabb modell szerint a Rad18 molekula által ubikvitilált PCNA kölcsönhat az SNM1A fehérjével. Az interakcióban azonban nemcsak az SNM1A N-terminálisán elhelyezkedő UBZ doménje vesz részt, hanem azonosítottak egy másik ubikvitilált PCNA kötő régiót is, a PIP motívumot. Ezen keresztül a PCNA-t köti közvetlenül(9. ábra). Az UBZ domént tartalmazó fehérjék közül a polη és polκ is tartalmaz hasonló PIP motívumot.



9.ábra: Az SNM1A működésének modellje(65)

Kísérletesen kimutatták, hogy az egér SNM1A knockout mutánsok rendkívül érzékenyék válnak DNS károsító ágensek hatására. Az SNM1A fehérje tehát működésével hozzájárul a sejt UV és DNS keresztkötő ágensekkel szembeni védelméhez. A pontos mechanizmus megismerése még további kutatások tárgya.

III. CÉLKITŰZÉS

A sejtek működését egymásra épülő szabályozó folyamatok koordinálják. Ilyen folyamatok közé tartozik az ubikvitiláció függő génexpresszió szabályozás, fehérjék proteaszómához kötött lebontása, illetve a DNS-hiba javító mechanizmusok. A DNS-hiba javító folyamatokban az ubikvitin szignál felismerésére az evolúció során az ubikvitin kötő domének különböző változatai alakultak ki. Az ubikvitin kötő domének keresztül, hogyan történik a DNS-hiba javító folyamatok szabályozása, még nem ismert részleteiben.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az ubikvitin kötő domének szabályozó szerepét az emberi DNS-hiba javító folyamatokban. Megfigyeltük, hogy a különleges C2HC típusú cinkujj-szerű struktúrával rendelkező ubikvitin kötő domén csak a DNS-hiba javító folyamatokban szerepet játszó fehérjékben található meg. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a C2HC domén szabályozó szerepét, szekvencia adatbázisokban olyan fehérjék után kutattunk, amelyek rendelkeznek ilyen ubikvitin kötő doménnel. Így fedeztük fel a C1orf124 gént, amely a Spartan fehérjét kódolja.

Fő célunk volt, hogy megvizsgáljuk a C1orf124/Spartan esetleges szerepét a DNS-hiba javító folyamatokban. A kérdés megválaszolásához a következő kísérletek elkészítését tűztük ki célul:

- 1) Szekvencia adatbázisok segítségével elemezzük a C1orf124/Spartan doménszerkezetét.
- 2) A feltételezett Spartan fehérje-domének szerepét meghatározzuk, azáltal hogy Spartan domén pontmutánsokat állítunk elő és vizsgáljuk kísérletesen.
- 3) Megvizsgáljuk a Spartan lokalizációját a sejtekben más DNS-hiba javító fehérjékhez viszonyítva.
- 4) *In vitro* és *In vivo* kísérletekben megnézzük a Spartan kölcsönhatását más DNS-hiba javító fehérjékkel.
- 5) Sejtérzékenységi tesztekben elemezzük a vad típusú és a mutáns Spartant kifejező humán sejtek fenotípusát.
- 6) Meghatározzuk a Spartan funkcióját a DNS-hiba javító folyamatokban.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV/1. Oldatok és pufferek

- LB tápfolyadék: Tripton (10g/l), NaCl (10 g/l), élesztőkivonat (5g/l), pH 7.5
- LB táptalaj: LB tápoldat, Bacto agar (1,5%)
- Az emberi sejtek tápoldata: 1×DMEM (89%,(Gibco)), 10% Foetal Bovine serum (Gibco), 1% antibiotikum mix: 1g streptomycin, 10⁶ NE penicillin /100 ml oldatban.
- A kísérletek során a következő antibiotikumokat használtuk: Ampicilin: 1000× (100mg/ml), Hygromicin: 300µg/ml, Puromicin:1 µg/ml és Neomicin: 1µg/ml koncentrációban.
- TBE puffer (10×): Tris base (108g/l), bórsav (55g/l), EDTA (0,5M –ból 40 ml/l)
- PBS oldat (10×): 80g NaCl, 2g KCl, 6,1g Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄ / 1 literben
- TBS puffer (10×): 1500mM NaCl, 200mM Tris HCl (pH 7,5)
- TBS TWEEN oldat (10×): TBS puffer, 0,05% TWEEN20
- Transzfer puffer (10×): 24,1g Tris, 111,6g glicin/ 1 literben
- SDS puffer (10×): 30,2g Tris, 144g glicin, 10g SDS / 1 literben

IV/2. A kísérlet során használt plazmid konstrukciók

Spartan (C1orf124) cDNS-t (cat. szám: DKFZp54N043Q) ImaGenes cégtől vásároltuk. Ezt a konstruktot pIL1767-nek neveztük el. A vásárolt cDNS szekvenciát klónoztuk pENTRY2B vektorba, amely a pIL1783 nevet kapta. A Spartan pontmutáns plazmid konstrukciókat a Quick Change site-directed mutagenesis kit (*Stratagene*) segítségével készítettük el. Ennek eredményeként UBZ pontmutáns C459S (pIL2026) , PIP pontmutáns YF331,332AA (pIL2115), SprT pontmutáns HE111,112AA (pIL2234), UBZ-PIP kettős pontmutáns C459S, YF331,332AA (pIL 2210) Spartan plazmid konstrukciókat készítettünk el. A használt oligonucleotidok: C459S (UBZ) mutáns Spartan O1638 (5'-GCC CAG TTT CTC AGA ATG AAG TTC TGG AGT CTC-3'), O1639: (5'-GAG ACT CCA GAA CTT CAT TCT GAG AAA CTG GGC-3') -pIL2026; Y331A/F332A (PIP) mutáns Spartan O2538 (5'-CCA AAA TGT TCT AAG CAA CGC CGC TCC TAG AGT ATC ATT TGC C-3'), O2539: (5'-GGC AAA TGA TAC TCT AGG AGC GGC GTT GCT TAG AAC ATT TTG G-3') - pIL2115; H111A/E112A (SPRT) mutáns Spartan O2683: (5'-GTA GAG ACC CTC CTG GCT GCA

ATG ATA CAT GCC-3'), O2684: (5'-GGC ATG TAT CAT TGC AGC CAG GAG GGT CTC TAC-3') -pIL2234. C459S Y331A/F332A (UBZ PIP) a kettős pontmutáns készítése során a mutáns fragmentet a pIL2115-ből klónoztuk a pIL2026-ba, amely a pIL2210 nevet kapta. A vad típusú (WT), C459S, és a H11A/E112A siRNS rezisztens Spartant a pIL1783, 2026 és 2234 segítségével készítettük el a következő oligonucleotidok segítségével O2662: (5'-CTA AGC AAC TAC TTT CCG CGA GTA TCA TTT GCC AAC C-3'), O2663 (5'-GGT TGG CAA ATG ATA CTC GCG GAA AGT AGT TGC TTA G-3'), amelyek a pIL2235, pIL2236, pIL2237 neveket kapták. A Y331A/F332A mutáns siRNS rezisztens Spartant a pIL2115 segítségével készítettük el a következő oligonucleotidok segítségével O2685: (5'-CCA AAA TGT TCT AAG CAA CGC CGC TCC GCG AGT ATC ATT TGC C-3') and O2686: (5'-GGC AAA TGA TAC TCG CGG AGC GGC GTT GCT TAG AAC ATT TTG G-3') , amely a pIL2238 nevet kapta. A C459S Y331A/F332A kettős mutáns, siRNS rezisztens konstrukciókat a pIL2236 segítségével, abból a mutáns fragment klónozása a pIL2238 klónba, amely a pIL2239 nevet kapta.

IV/3.A fehérjék tisztítása *in vitro* kísérletekhez

IV/3.1. A His-ubikvitin tisztítása

A pET17c vektorba klónozott His-ubikvitint BL21 (DE3) baktérium (*Stratagene*) tápoldatban növesztettük. A sejteket 37°C-on növesztettük LB médiumban, amely 100 µg/ml ampicillint tartalmazott. A sejtek növekedésének logaritmikus fázisában a sejtekhez 0.1 mM IPTG-t adtunk, amely indukálta a fehérje termelést. Az indukció után három óra elteltével a sejteket összegyűjtöttük, majd feltártuk szonikálással pufferA-ban (20 mM HEPES pH 7.5, 0.01% Nonidet P-40, 10% glycerol 0.5 mM β mercapto-etanol). Ezt a puffert kiegészítettük 500 mM NaCl és proteáz inhibitor koktéllal (Mini-Complete, *Roche*). A sejtlyázumot felvittük Ni-NTA agaróz oszlopra (*Quiagen*). Az oszlopot mostuk puffer A-val, melyet kiegészítettünk egyrészt 500 mM NaCl, az utolsó mosó puffert pedig 100 mM NaCl és 20 mM imidazollal. A His-ubikvitin fehérjét 100 mM NaCl and 200 mM imidazollal kiegészített pufferA-val eluáltuk az oszlopról. Végezetül az imidazolt dialízis segítségével távolítottuk el 50 mM NaCl-al kiegészített pufferA oldattal.

IV/3.2. Az emberi Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13, RFC, UBA1 és HLT fehérjék tisztítása

Az emberi Rad6-Rad18, Mms2-Ubc13, RFC, UBA1 és HLT fehérjék tisztítását és az *in vitro* PCNA ubikvitilációs esszét irodalomban leírt protokoll alapján készítettük el(50). A

monoub-, és poli-ub-PCNA tisztításához szükséges DNS-t DNaseI hasítottuk 1mM MgCl₂ tartalmú oldatban, és Q-sepharose (Amersham) oszlopra kötöttük, a puffert kiegészítettük 10 mM DTT, 100 mM NaCl oldatokkal. Az oszlop mosása puffer B-vel (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10% glycerol), majd a mono-ub- és poli-ub-PCNA-t eluáltuk 600 mM NaCl-al kiegészített pufferB-vel. Ezt követően a mintát Ni-NTA agaróz oszlopra kötöttük (*Qiagen*). Az oszlopot mostuk 500 mM NaCl-al kiegészített puffer B-vel, majd az utolsó mosást 20 mM imidazollal kiegészített puffer B-vel végeztük. A fehérjéket az oszlopról 500 mM imidazol és 40 mM EDT, 400 mM NaCl tartalmú pufferB-vel eluáltuk. Végezetül az imidazolt dialízissel távolítottuk puffer C segítségével (20 mM HEPES, 1 mM DTT, 10% glycerol, 1 mM EDTA), amelyet 500mM NaCl, valamint 50 mM NaCl-al egészítettünk ki. A tisztított mono-ub-, és poli-ub-PCNA-t szétosztottuk több csőbe, majd -80°C-on tároltuk.

IV/3.3. A Spartan tisztítása

A Spartan fehérje tisztításához klónoztuk a vad típusú (WT), UBZ, PIP, és az UBZ PIP domén pontmutánsok cDNS-t glutathione S-transferase (GST) és Flag-tag hordozó plazmid konstrukcióba, amely *S. cerevisiae* galaktóz-indukált promotert tartalmaz (pBJ842). Ennek eredményeként a pIL2116, pIL2117, pIL2119, és pIL2218 plazmid konstrukciókat készítettük el.

A vad típusú (WT) és a mutáns GST-Flag-Spartan fehérjéket párhuzamosan expresszáltattuk proteáz defektes BJ5464 élesztő törzsben. A kultúrát tízszeresére hígítottuk, friss médiumba helyeztük, amely dextróz mentes volt, de tartalmazott 2% tejsavat és 3% glycerolt, majd egy éjszakás inkubáció után 0,2 % galaktózt adtunk a tápoldathoz. 5 órás inkubációt követően összegyűjtöttük a sejteket és pufferD-ben (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, 0.01% Nonidet P-40, 10% glycerol), amelyet 500 mM NaCl és proteáz inhibitor koktéllal egészítettünk ki (Mini-Complete, *Roche*) -feltártuk sejtörő segítségével. A sejtízátumot felvittük glutathione-Sepharose oszlopra (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Először az oszlopot mostuk 500 mM NaCl-al kiegészített puffer A-val, majd 200 mM NaCl-al kiegészített pufferD-vel. A GST-Flag-Spartan fehérjéket 20 mM glutathione és 200 mM NaCl tartalmú puffer A-val. A Spartan fehérjét tartalmazó frakciókat szétosztottuk több csőbe, majd -80 °C-on tároltuk.

IV/4. GST pull-down kísérlet

A tisztított GST vagy GST-Flag-Spartan fehérjéket (3µg) négy órán keresztül, 4 °C-on Glutathion-Sepharose gyöngyön inkubáltuk (*Amersham*) tisztított PCNA-vel, monoubikvitin- vagy poliubikvitin-PCNA-vel (1µg) 25 V/V% puffer D-ben (40 mM Tris HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 10 % glycerol, 0.01 % NP40) és 75 V/V% puffer E-ben (40 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl és 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10 % glycerol, 0.01 % NP40). A gyöngyöket háromszor mostuk a puffer E-vel, majd 20 mM glutathion tartalmú E pufferrel eluáltuk. A kísérlet reakcióelegyét 10 % SDS/PAGE gélen elválasztottuk, majd Western blot analízissel vizsgáltuk.

IV/5. *In vitro* deubikvitilációs kísérlet

A tisztított monoubikvitin vagy poliubikvitin-PCNA-t (1 µM) inkubáltuk USP1/UAF1 fehérje komplexel puffer F-ben (50 mM HEPES pH:7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT). A reakcióelegyet 45 percig, 37 °C-on inkubáltuk 150 nM Spartannal. A reakciót 2X loading puffer hozzáadásával állítottuk meg. A reakciót 10 % SDS/PAGE gélen elektroforézissel ellenőriztük. Az Usp1 hatását Western blot analízissel, anti-PCNA 1:200 ellenanyaggal mutattuk ki (*Santa Cruz, sc-56*).

IV/6. A sejtek immunfestése

A kísérletet megelőző este 6 lyukú lemezre helyezett fedőlemezekre sejteket ültettünk ki. Másnap a sejteket 1xPBS-sel mostuk, és egyes esetekben 4% paraformaldehid/1xPBS (pH7,5) oldattal fixáltunk a fedőlemezekre 10 percig, szobahőmérsékleten. A fixáló oldat eltávolítása után 0,5% Triton X-100/1xPBS oldattal 5 percig mostuk. A lemezeket ezután blokkoltuk 1% BSA 0,1% Triton X-100 oldattal 1 órán keresztül. Az ellenanyagot a fedőlemezekre csepegtettük, az elsődleges ellenanyaggal 1 órán át inkubáltunk, majd a lemezeket 2x5 percig mostuk 1% Triton X-100 oldattal. A másodlagos ellenanyaggal szintén 1 órán keresztül inkubáltunk. Az idő elteltével a mintákat 3x5 percig mostuk 0,1% Triton X-100 oldattal. Ezt követően a sejtmagokat DAPI-val festettük (DAPI 1000x oldva 25% glycerolos oldatban), és a fedőlemezt a rajta lévő sejtekkel együtt a tárgylemezen rögzítettük. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

IV/7. A használt sejtkultúrák, lokalizációs vizsgálatok

HeLa, HEK293FT és HCT116 sejteket 10% FCS (*Sigma*) tartalmú, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Sigma*) 37°C inkubátorban növesztettük.

A lokalizációs kísérletekhez a vad típusú (WT), SPRT domén, UBZ domén, PIP box, és az UBZ-PIP box mutáns Spartan cDNS-eket N-terminálison Flag tag-et hordozó pRK2F vektorba klónoztuk, amelyek pIL2240, pIL2241, pIL2242, pIL2243, és pIL2244 neveket kapták. A vad típusú (WT) Spartant hasonlóan az előzőekhez EGFP tag-et hordozó pEGFP vektorba klónoztuk (pIL1785). A transzfekciót Lipofectamine 2000 reagenssel végeztük a megadott protokoll szerint. A mintákat Olympus confocal LSM vagy Leica confocal LSM mikroszkópokkal vizsgáltuk.

FLAG-Spartant expresszáló sejteket anti-FLAG ellenanyaggal (*Sigma, cat. numb.: F7425*) 1:200 hígításban, és FITC-konjugált anti-nyúl ellenanyagokkal (*DAKO*) 1:1000 hígítással immunfestettük. Az endogén PCNA immunfestéséhez anti-PCNA ellenanyagot (*Santa Cruz, sc-56*) 1:200 hígítással és Cy3-konjugált anti-egér ellenanyagot (*Sigma, cat. numb.: C2181*) 1:1000 hígítással használtunk. A mintákat 1 µg/ml DAPI és 25% glycerol tartalmú PBS-ben helyeztük a tárgylemezre. A mintákat Olympus confocal LSM vagy Leica confocal LSM mikroszkópokkal vizsgáltuk.

A replikációs villa megjelenítéséhez 25µM BrdU bázis analógot tartalmazó DMEM-ben növesztettük a sejteket. A sejteket mostuk 1×PBS oldattal, majd fixáltuk 3% paraformaldehid oldattal, 10 percig. A sejteket denaturáltuk 2.5 M HCl, 30 percig. A sejteket kezeltük 0.5% Triton X-100 PBS oldattal 5 percig, majd blokkoltuk 3% BSA tartalmú 0.1% Triton X-100 PBS oldattal. A BrdU jelölést anti-BrdU ellenanyaggal (*Ab-direct serotec, cat. numb.: 170107*) 1:300 hígítással, és anti-patkány Alexa Fluor 488 ellenanyaggal (*Invitrogen, Lot: 421559*) 1:1000 hígítással immunfestettük. FLAG-Spartant anti-FLAG ellenanyaggal (*Sigma, M2 clone*) 1:200 hígítással, illetve Cy3 konjugált anti-egér ellenanyaggal (*Sigma, cat. numb.: C2181*) 1:1000 hígítással immunfestettük. A mintákat Olympus confocal LSM vagy Leica confocal LSM mikroszkópokkal vizsgáltuk.

IV/8 Felhasznált siRNS-k

A gének csendesítéséhez siRNS duplexeket (*Ambion*) használtunk. HeLa sejteket transzfektáltunk különböző siRNA duplexekkel (100 pmol/minta) Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) reagens segítségével, 6 lyukú lemezekben. A sejteket 37 °C-on, 48 órán keresztül

inkubáltuk. A kísérletekhez a következő RNS target szekvenciákat használtuk (sense strand) Spartan 1.(5'- CUA CUU UCC UAG AGU AUC A-3'), Spartan 2. (5'- GGA UGU GAG UGG GUC UGA A-3'), Spartan 3. (5'-CAA GGA UAA GUG UAA CAG U-3'), Rad18 (5'- GUU CAG ACA UCA UAA GAG A-3') HLTF (5'-GAA AAG CGG UUU CAG AUC A-3'), Mms2 (5'-AGG ACA AAU UAU GAA AAC A-3'), és Ubc13 (5'-GGA AGA AUA UGU UUA GAU A-3').

Az Usp1 specifikus shRNS előállításához szükséges oligonukleotidokat hibridizáltuk O2793 (5'- GAT CTT CGG CAA TAC TTG CTA TCT TAC AAG AGA TAA GAT AGC AAG TAT TGC CGA TTT TTA -3') és BglII - HindIII restrikciós hasítóhelyekre klónoztuk hDNA-Neo vektorba, amely a pIL2409 nevet kapta.(66)

A Spartan specifikus shRNS előállításához szükséges oligonukleotidokat hibridizáltuk O2689 (5'- AGC TTC TAC TTT CCT AGA GTA TCA TTC AAG AGA TGA TAC TCT AGG AAA GTA GTT TTT TG-3') és BglII - HindIII restrikciós hasítóhelyekre klónoztuk hDNA-Neo vektorba, amely a pIL2245 nevet kapta.(66)

IV/9. A stabil sejtvonalak készítése

HeLa illetve HEK293 FT sejteket a géncsendesítéshez szükséges plazmid konstrukciót transzfektáltunk Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) reagenssel 6 lyukú lemezen. A transzfektálás után 48 óra elteltével a sejteket 10% FCS (*Sigma*), 1 mg/ml G-418 SULPHATE (*Gibco, cat. numb.: 11811064*) DMEM-re helyeztük. A sejteket 10 napig növesztettük, mikor a sejtek kolóniákat képeztek a lemezen, izoláltuk az egyes kolóniát, majd felnövesztve egyedi sejtvonalat hoztunk létre.

A FLAG-Spartant stabilan expresszáló HeLa sejtvonal készítéséhez a Spartan cDNS-t a pIL1783 vektorból átklónoztuk egy FLAG-Hygro plazmid konstrukcióba, amely a pIL2240 nevet kapta. A sejtek transzfekcióját és a kolóniák növesztését hasonlóan végeztük az előzőekhez, azonban 300 µg/ml hygromicin (*Invitrogen A9277*) DMEM-ben növesztettük a sejteket. A FLAG-Spartan-Hygro stabil sejtvonalat egyes kísérletekben UV (20J/m²), illetve MMS (0,01%)-el kezeltük.

A FLAG-Polh-t stabilan expresszáló HeLa sejtvonal készítéséhez a Polh DNS szekvenciáját a pIL1399-ből klónoztuk Flag-Hygro vektorba, amely a pIL1967 nevet kapta. A stabil sejtvonalat az előzőhöz hasonlóan készítettük.

GFP-Spartant transzfektáltunk Rad18 +/- HCT116 sejtekbe (34). A Rad18-at DsRed-Rad18 plazmid konstrukcióval komplementáltuk vissza.

IV/10. Áramlási citométer alapú sejtérzékenységi teszt

HeLa sejteket transzfektáltunk különböző plazmid konstrukcióval illetve siRNS-ekkel Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) reagens segítségével 6 lyukú lemezen. A transzfektált sejteket 24 óra elteltével kevertük GFP-t stabilan expresszáló HeLa sejtekkel kb. 3:1 arányban (transzfektált: GFP sejtek). A következő nap kezeltük a sejteket különböző DNS károsító ágenssel, majd hét napig növesztettük a sejteket. Ezután FACS (*Guava Easy site System*) segítségével meghatároztuk a GFP pozitív illetve negatív sejtek arányát, amelynek segítségével meghatároztuk a sejtek érzékenységét a különböző DNS károsító ágensekkel szemben, és grafikonon ábrázoltuk.

IV/11. Komplementációs analízis sejt érzékenységi tesztben

Komplementációs analízishez szükséges plazmid konstrukciókat készítettünk. A vad típusú (WT), SPRT domén, UBZ domén, PIP box és az UBZ PIP box mutánsok siRNS rezisztens Spartan cDNS-eket Flag tag-et N-terminálison hordozó, pRK2F vektorba klónoztuk, amelyek pIL2246, pIL2247, pIL2248, pIL2249, és pIL2250 neveket kapták. A komplementációs analízist hasonlóan végeztük, mint az előző fejezetben. A Spartan csendesítését stabilan biztosító sejt vonalat transzfektáltuk a különböző mutánsok expresszióját biztosító plazmid konstrukciókkal Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) reagens segítségével 6 lyukú lemezen, mint Flag-üres, siRNS rezisztens vad típusú (wild type), SPRT, UBZ, PIP és az UBZ, PIP mutánsok Flag-Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukció vagy a Rad18 siRNS (*Ambion*). A transzfekció után 24 óra elteltével a sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló sejtekkel 3:1 arányban. A következő nap kezeltük a sejteket különböző DNS károsító ágenssel, majd hét napig növesztettük a sejteket. Ezután FACS (*Guava Easy site System*) segítségével meghatároztuk a GFP pozitív illetve negatív sejtek arányát, amelynek segítségével meghatároztuk a sejtek érzékenységét a különböző DNS károsító ágensekkel szemben, és grafikonon ábrázoltuk.

IV/12. Immunoprecipitáció

$2,5 \times 10^6$ sejtet lizáltunk 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 1mM PMSF, Protease inhibitor koktél (Sigma P8340) pufferben. A sejteket szonikáltuk, majd jégen inkubáltuk 20 percig. A FLAG tag-el ellátott fehérjéket egér M2 Flag gyöngyre (*Sigma*) kötöttük, majd a gyöngyöt mostuk háromszor 1 ml lízis pufferrel. A precipitált fehérjéket és a sejt-lizátumot Western blot analízissel vizsgáltuk, egér anti-PCNA HRP (Santa cruz cat. numb. sc-56), egér anti-FLAG HRP (Sigma M2 A8592), patkány anti-HA HRP (Roche, cat.numb. 12013819001 clone 3F10), nyúl anti-Tubulin (Santa cruz cat. numb. sc-9104) és kecske anti-nyúl HRP (Millipore AP132P) ellenanyagokkal.

IV/13. Testvér kromatidák közötti kicserélődés vizsgálata (SCE analysis)

A sejteket sötétben, két sejtciklus elteltéig 30 μ M bromodeoxyuridine (BrdU) tartalmú tápoldatban inkubáltuk. A sejteket colcemid (Sigma, cat. numb. D1925) oldattal kezeltük két órán keresztül. A sejteket összegyűjtöttük és kezeltük 75 mM KCl oldattal, 5 percig. A sejteket fixáltuk metanollal két percig, majd metanol-ecetsav (3:1) elegyben felszuszpendáltuk. A sejtszuszpenziót üveg fedőlemezekre cseppentettük, majd levegőn megszárítottuk. A lemezeket acridine orange (0,1 μ g/ml) (Sigma, cat. numb. A8097) oldattal festettük, majd a mintákat Leica konfokális LSM mikroszkóppal vizsgáltuk(67).

V. EREDMÉNYEK

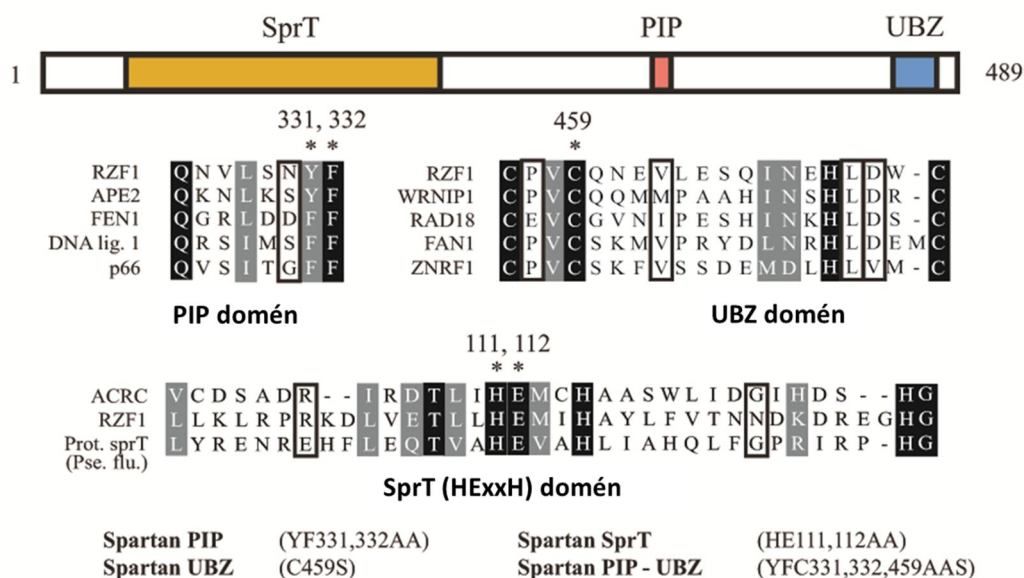
V/1. A C1orf124 azonosítása és a szerkezete

A DNS-hiba javításban résztvevő fehérjék számos tagja rendelkezik ubikvitin kötő doménnel. Munkánk során a DNS-hiba javító folyamatok szabályozásában szerepet játszó fehérjék közötti kapcsolatokat keressük. Megfigyeltük, hogy a C2HC konszenzus szekvenciájú ubikvitin kötő cinkujj-szerű domén csak a DNS-hiba javításáért felelős fehérjékben található meg, mint például a Rad18 fehérjében. Ezért megvizsgáltuk, hogy valójában más, még nem azonosított fehérjében is megtalálható-e ez a domén. Az ismert C2HC domént tartalmazó DNS-hiba javító fehérjék génjei mellett az adatbázisban egy új gént találtunk, C1orf124/Spartan jelzéssel, amely szintén rendelkezik ezzel a doménnel. A továbbiakban a C2HC domént UBZ doménnek fogjuk nevezni. Ezek alapján felvetődött a kérdés, hogy ez az ismeretlen fehérje lehet-e egy újabb szereplője a DNS-hiba javító mechanizmusoknak. Célul tűztük ki ennek a kérdésnek a megválaszolását.

A C1orf124/Spartan, amelyet a továbbiakban Spartannak hívunk, génje az 1. kromoszóma q42.12–43 régiójában található, és egy 489 aminosavból álló 55,134 kDa tömegű fehérjét kódol. A szekvencia adatbázis adatai alapján feltételezett homológjai csak a gerincesekben találhatók meg. Az rendelkezésre álló információk alapján a Spartan N-terminálisán hordoz egy SprT domént, amelyben egy jellegzetes HExxH aminosav szekvencia található. Baktériumokban végzett kísérletek alapján ennek a HexxH motívumnak feltehetően metalloproteáz funkciója lehet, azonban emlős sejtekben funkciója nem ismert (68). A fehérje C-terminális végén helyezkedik el az UBZ domén, amelyről feltételeztük, hogy az ubikvitin kötésben van szerepe. A Tumorscape Adatbázis adatai szerint Spartan génközeli kromoszóma régió delécioja esetén a rák különböző fajtái alakulhatnak ki magas számban, amelyet 3131 különböző tumor vizsgálatával határoztak meg (69).

Megvizsgáltuk, hogy amennyiben a Spartan aktív UBZ doménnel rendelkezik, vajon tartalmaz-e más olyan domént, amely az ismert hibajavító fehérjékben is jelen van. Így fedeztük fel, hogy egy lehetséges PIP motívumot is tartalmaz. A PIP egy PCNA interakciós motívum, amely számos DNS-hiba javításban részt vevő fehérjében is megtalálható. Konszenzus szekvenciája Qxxhxxaa ahol 'h' valamely hidrofób aminosavat, az 'a' aromás aminosavat jelent.

A fehérje-doménszerkezet alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a Spartan egy lehetséges új DNS-hiba javító fehérje, amelyet számos kísérleti rendszerben terveztünk körbejárni. Elsőként a Spartan egyes doménjeinek konszenzus szekvenciáiban pontmutációkat hoztunk létre. Így az SprT doménben a 111 és 112-es, a PIP motívumban a 331 és 332-es, az UBZ doménben 459-es aminosavakat alakítottunk át mutagenizáló PCR segítségével (10. ábra).



10. ábra: A C1orf124/Spartan domén szerkezete

A szükséges plazmid konstrukciók elkészítése után a Spartan expresszióját a sejtekben illetve az siRNS-sel történő gécscsökkentéseket Western blot analízissel ellenőriztük. Az ellenőrző kísérletek eredményét a 11. ábra mutatja be.

A Spartan csendesítését háromféle target szekvenciát hordozó siRNS-sel végeztük. A Spartan csendesítését biztosító siRNS-eket és a FLAG tag-et hordozó Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukciót kotranszfektáltuk a sejtekben. 48h elteltével anti-FLAG Western blot analízissel ellenőriztük a csendesítés hatékonyságát (11. ábra A panel).

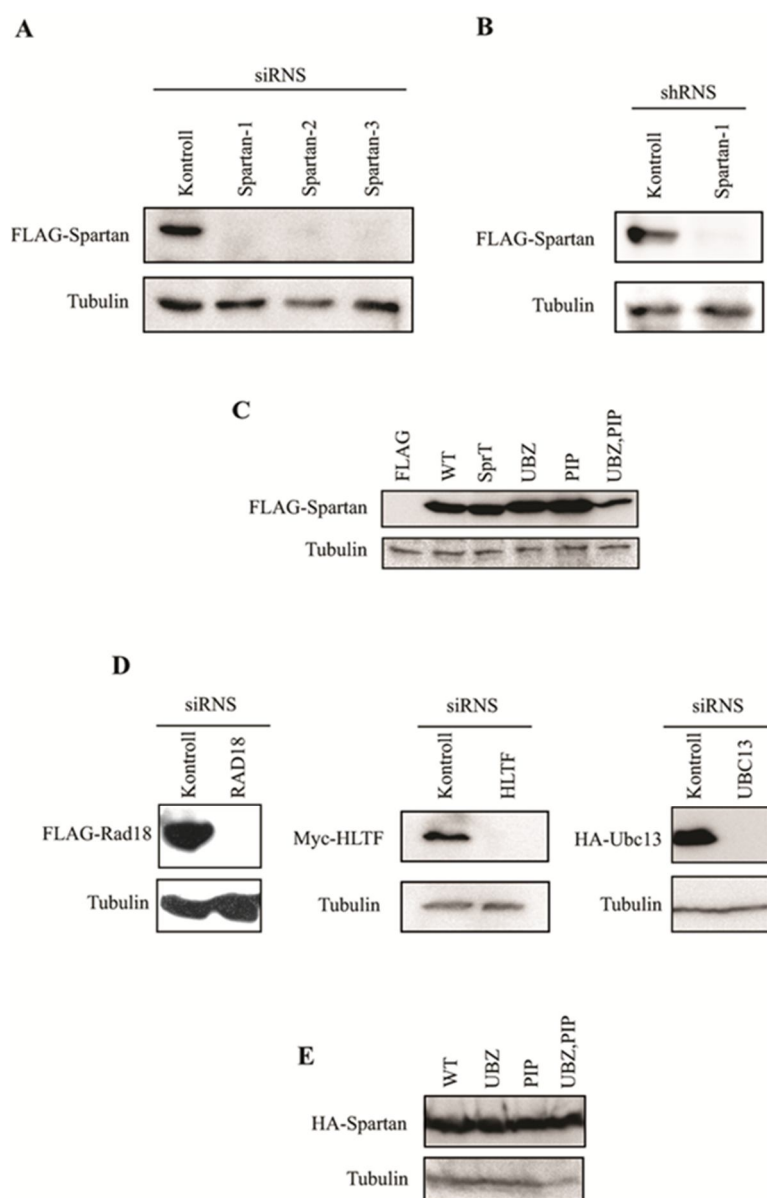
A Spartant stabilan csendesítő sejtvonalat ellenőrzésének érdekében transzfektáltuk a FLAG tag-et hordozó, shRNS rezisztens Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval. A csendesítés mértékét Western blot analízissel határoztuk meg (11. ábra, B panel).

A Spartan domén mutánsok expresszióját is vizsgáltuk a sejtekben. A sejteket transzfektáltuk FLAG tag-et hordozó különböző pontmutánsok expresszióját biztosító

plazmid konstrukcióval, majd Western blot analízissel vizsgáltuk expressziójukat a sejtekben (11. ábra, C panel).

A lokalizációs kísérletekben használt gének siRNS-sel történő csendesítésének hatását is vizsgáltuk. A sejteket kotranszfektáltuk az siRNS-sel illetve a csendesítendő gén expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval, majd Western blot analízissel vizsgáltuk a csendesítés mértékét (11. ábra, D panel).

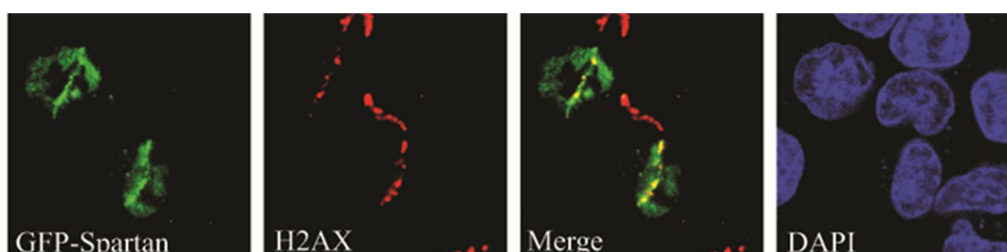
A Spartan domén mutánsok expresszióját vizsgáltuk a sejtekben. A sejteket transzfektáltuk HA tag-et hordozó különböző pontmutánsok expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval, majd Western blot analízissel vizsgáltuk expressziójukat a sejtekben (11. ábra, E panel).



11. ábra: Az alkalmazott konstruktok ellenőrzése.

V/2. A Spartan a DNS károsodás helyéhez lokalizál

Először lokalizációs kísérletek segítségével kerestünk bizonyítékot arra, hogy a Spartan DNS-hiba javító fehérje-e. A DNS-hiba javító fehérjékre jellemző, hogy a DNS károsodás helyéhez lokalizálnak. Ezért megvizsgáltuk, hogy lézersugárral (laser microirradiation) kezelt sejtekben a Spartan a károsodás helyéhez lokalizál-e. A kísérlet során GFP tag-et hordozó Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval transzfektáltunk HCT116 sejteket, majd lézersugárral DNS károsodást idéztünk elő. A sejtek kezelése után 20 perc elteltével a vad típusú (WT) Spartan kolokalizációt mutatott a lézersugár helyével, amelyet γ -H2AX ellenanyaggal jelöltünk. A kísérlet eredményéből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan a DNS károsodás helyéhez lokalizál (12. ábra).

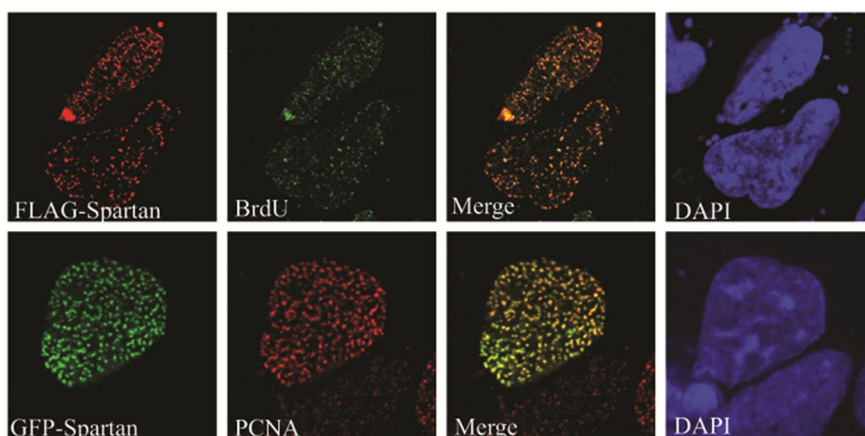


12. ábra: A Spartan a DNS károsodás helyéhez lokalizál.

A képen GFP tag-et hordozó vad típusú (WT) Spartan expressziója látható HCT116 sejtekben. A sejteket lézersugárral kezeltük. A kezelés után 20 perccel a sejteket immunfestettük anti-GFP (zöld), illetve γ -H2AX (piros) ellenanyagokkal. A képen a harmadik oszlop jelöli az első és második egymásra vetítését (Merge). A sejtmag DAPI festéssel (kék)látható.

A következő kérdés az volt, hogy a Spartan képes-e az aktív replikációs villához lokalizálni. A BrdU (bróm-deoxiuridin), mint timin analóg képes beépülni a DNS-be szintézis során. A BrdU jelölt, anti-BrdU ellenanyaggal immunfestett sejtekben a replikációs villák apró sejtmagi fókuszokként láthatók. A polimerázok processzívítási faktoraként azonosított PCNA fehérje immunfestése esetében is láthatóak az aktív replikációs villák. Ezeknek a módszereknek a segítségével megvizsgáltuk a Spartan lokalizációját a replikációs villához viszonyítva.

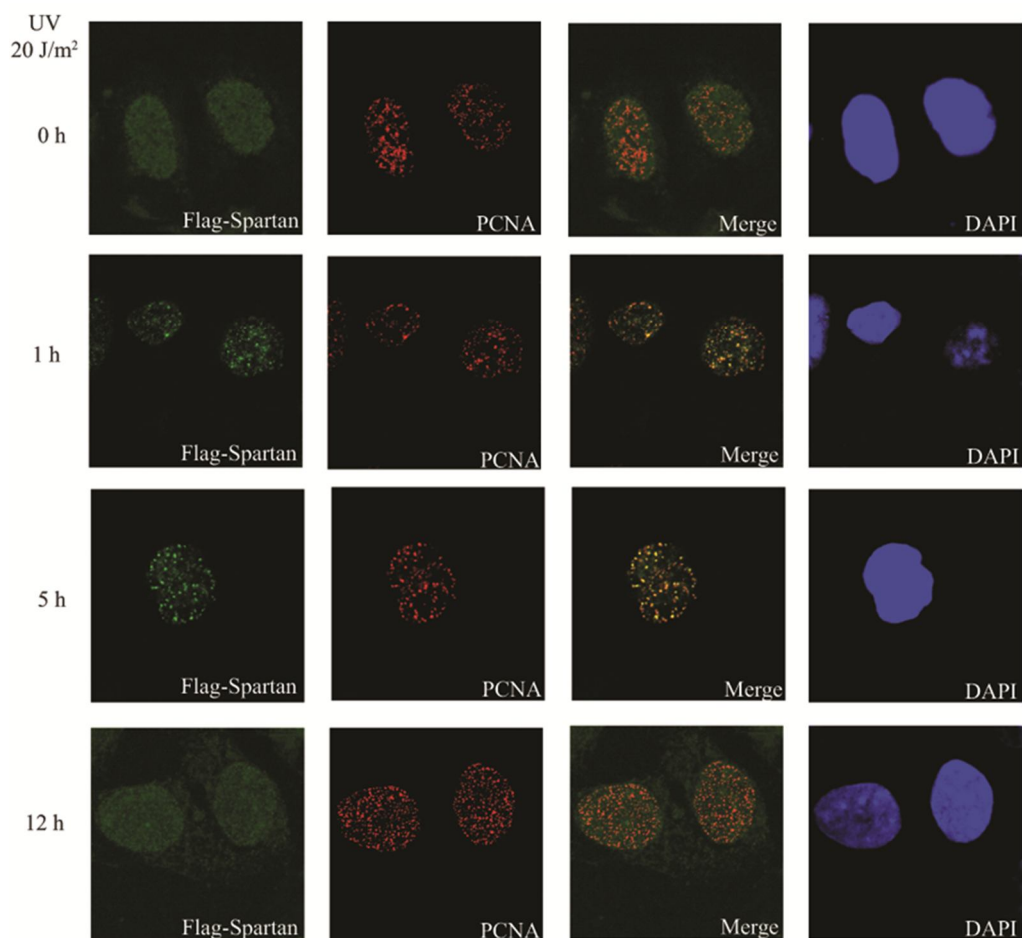
A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a Spartan kolokalizációt mutat a BrdU beépülés helyével, valamint a PCNA fehérjével. Ebből arra következtettünk, hogy a Spartan a replikációs villához lokalizál (13. ábra).



13. ábra: A Spartan a replikációs villához lokalizál.

A képen a FLAG illetve a GFP tag-et hordozó vad típusú (WT) Spartan látható. A sejteket BrdU bázis analóggal jelöltük (felső sor), majd immunfestettük anti-BrdU (zöld) ellenanyaggal a transzfekciót követő 24 óra elteltével. Másik esetben (alsó sor) a sejteket immunfestettük anti-PCNA-vel (piros) , illetve anti-FLAG ellenanyagokkal. Az első és második oszlop képeinek egymásra vetítését a harmadik oszlop (Merge) mutatja be. A sejtmagok festése DAPI (kék) festéssel látható.

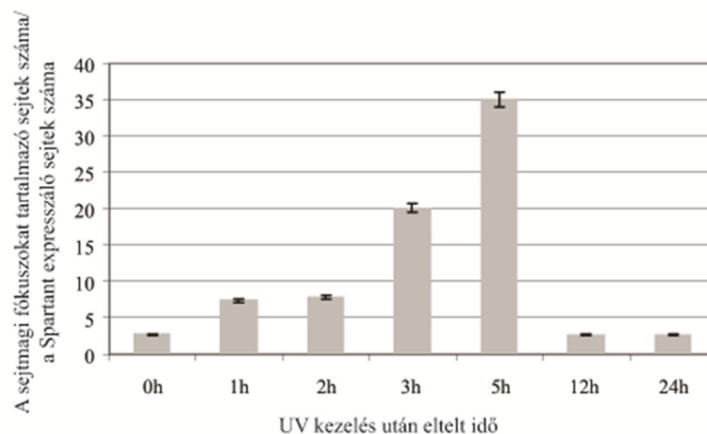
További bizonyítékot is kerestünk, hogy a Spartan replikációs villához történő lokalizációja DNS károsodás függő. Ezért megvizsgáltuk, hogy alacsonyabb szintű expresszója mellett, ahol nem formál sejtmagi fókuszokat, ott hogyan változik lokalizációja. A kísérlethez FLAG-tag-et hordozó Spartan expresszóját biztosító stabil HeLa sejtvonalat hoztunk létre. Az elkészült stabil sejtvonalt vizsgáltuk a Spartan lokalizációjának változását UV-besugárzás hatására, valamint lokalizációját a PCNA által kijelölt replikációs villához (14. ábra).



14. ábra: A Spartan lokalizációja stabilan expresszáló HeLa sejtekben UV kezelés hatására.

A képen FLAG tag-et hordozó Spartant stabilan expresszáló HeLa sejtek láthatók. A sejteket UV fénnyel (20J/m^2) kezeltük, majd immunfestettük különböző időpontokban anti-FLAG (zöld) illetve anti-PCNA (piros) ellenanyagokkal. A harmadik oszlop ábrázolja az első és a második oszlop egymásra vetítését (Merge). A sejtmagok DAPI (kék) festéssel láthatók.

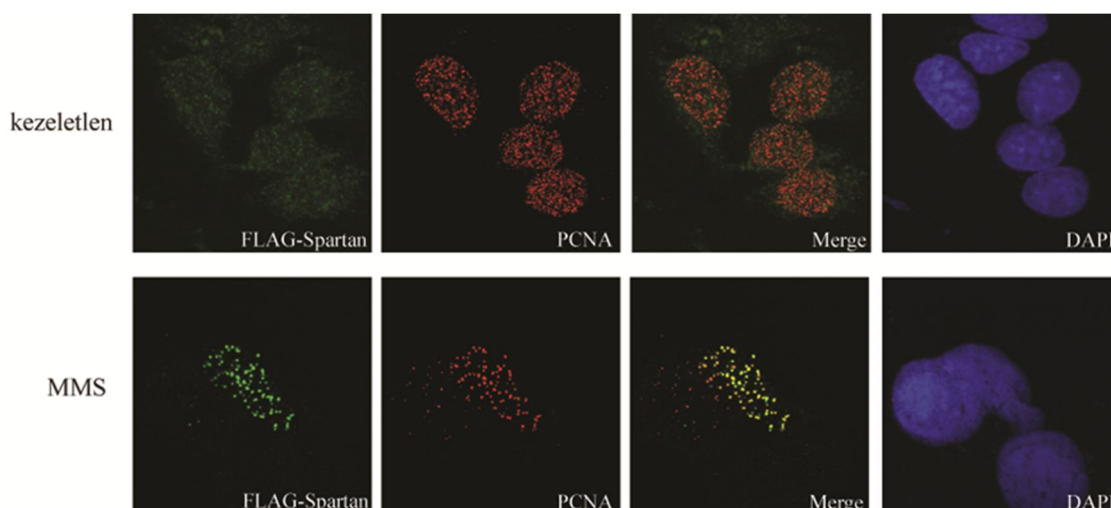
A kezeletlen sejtekben azt figyeltük meg, hogy a Spartan homogén eloszlást mutat a sejtmagban, míg UV kezelés hatására sejtmagi fókuszokat alkot a kezelést követően 1 óra elteltével. A kezelést követően 5 óra elteltével volt a legmagasabb a sejtmagi fókuszokat tartalmazó sejtek száma, míg a Spartan 12 óra elteltével ismét homogén eloszlást mutatott. A kísérlet eredményét grafikonon ábrázoltuk, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó és a transzfektált sejtek százalékos arányát (15. ábra).



15. ábra: A Spartan stabilan expresszáló HeLa sejtvonalban a Spartan lokalizációjának időbeli változása UV kezelés hatására.

Az ábrán a 14. képen látható kísérlet eredményének számszerűsített változatát mutatjuk be, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó és a transzfektált sejtek százalékos arányát. A képen három kísérlet eredménye látható.

Az előbbi kísérlet eredményét más DNS károsító ágens alkalmazásával is megerősítettük. MMS (Methyl Methanesulfonate 0,01 V/V %), DNS metiláló ágens hatására a Spartan szintén sejtmagi fókuszokat alkotott (16. ábra) 5 óra elteltével.



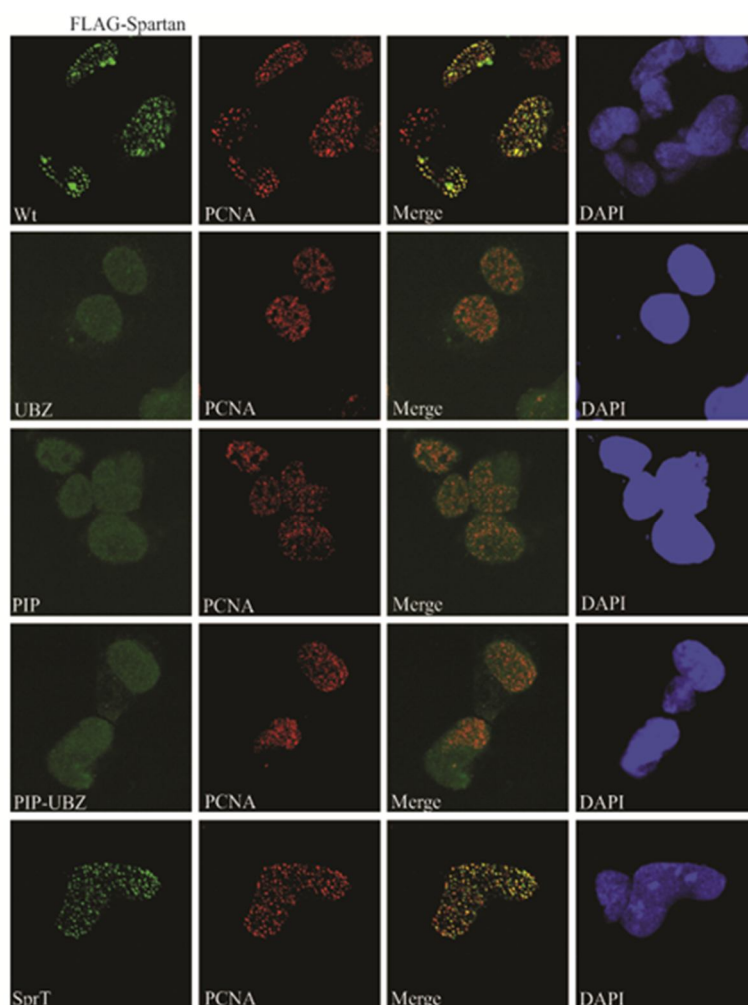
16. ábra: A Spartan lokalizációja Spartan stabilan expresszáló HeLa sejtekben MMS kezelés hatására.

A képen FLAG tag-et hordozó Spartan stabilan expresszáló HeLa sejtek láthatók. A sejteket 0,01% MMS-el kezeltük. A sejteket anti-Flag (zöld) illetve anti-PCNA (piros) ellenanyagokkal immunfestettük a kezelés után 5 óra elteltével. A harmadik oszlop ábrázolja az első és a második oszlop egymásra vetítését (Merge). A sejtmagok DAPI (kék) festéssel láthatók.

A lokalizációs kísérletek eredményei alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan hasonlóan más DNS-hiba javító fehérjéhez, a DNS károsodás helyéhez képes lokalizálni.

V/3. A Spartan lokalizációja függ a PIP és UBZ doménjétől

További lokalizációs kísérletekben megvizsgáltuk az egyes domének szerepét a Spartan lokalizációjában. Ezért HeLa sejtekben vad típusú (WT), SprT (metalloproteáz), PIP (PCNA kötő motívum) és UBZ (Ubikvitin kötő domén) pontmutáns Spartant expresszáltattunk, majd követtük lokalizációjukat a PCNA fehérjéhez viszonyítva. Azt figyeltük meg, hogy az SprT domén mutáns hasonló lokalizációt mutatott, mint a vad típusú Spartan, míg a PIP és az UBZ mutánsok nem képesek sejtmagi fókuszokat alkotni (17. ábra). Azt a következtetést vontuk le, hogy az UBZ és a PIP domének elengedhetetlenek a Spartan lokalizációjához.



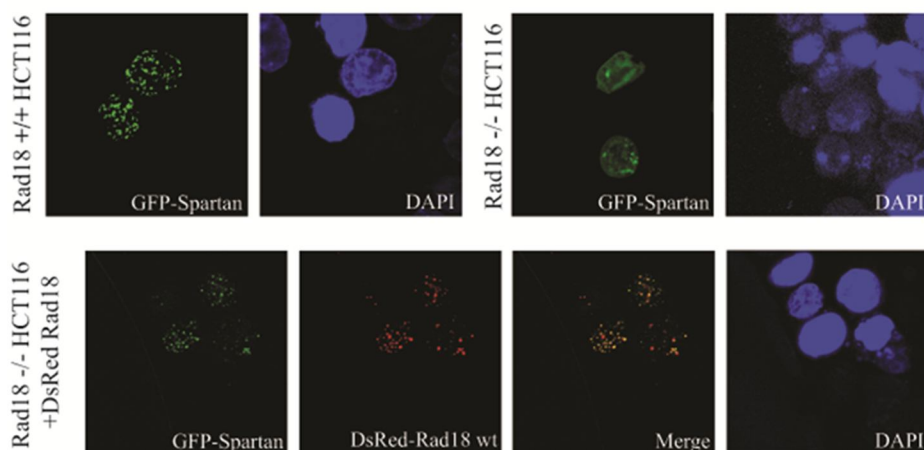
17. ábra: A vad típusú (WT), az SprT, PIP és az UBZ pontmutáns Spartan lokalizációja.

A képen FLAG tag-et hordozó vad típusú kezeletlen (WT), PIP, UBZ, PIP-UBZ és SprT pontmutációt hordozó Spartan expresszáló HeLa sejtek láthatók. A sejteket anti-FLAG (zöld) illetve anti-PCNA (piros) ellenanyagokkal immunfestettük a transzfekciót követő 24 óra elteltével. A harmadik oszlop az első két oszlop képeinek egymásra vetítését mutatja be (Merge). A sejtmagok (kék) DAPI festéssel láthatók.

V/4. A Spartan lokalizációja függ a Rad18-től

Rad18 ubikvitin ligáz a Rad6 ubikvitin konjugáló enzimmal képes monoubikvitilálni a PCNA-t DNS károsodás hatására. A korábbi lokalizációs kísérletekben azt figyeltük meg, hogy a Spartan a replikációs villához lokalizál a Rad18 DNS-hiba javító fehérjéhez hasonlóan (70). Ezért a következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a Spartan kolokalizációt mutat-e a Rad18-al illetve, a Rad18 hogyan befolyásolja lokalizációját.

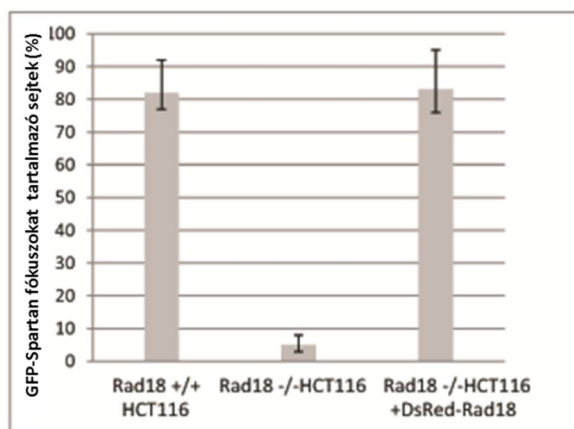
A Spartan lokalizációját először Rad18 $-/-$ HCT116 sejtekben vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a Spartan a Rad18 $-/-$ sejtekben nem képes sejtmagi fókuszokat alkotni, azonban azokban a mintákban, ahol a Rad18-at komplementáltuk, azaz DsRed Rad18-at expresszáltattunk, ott helyreállt a Spartan lokalizációja és kolokalizációt mutatott a Rad18-al (18. ábra). A kísérleti eredmény tükrében azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan lokalizációjához szükséges a Rad18.



18. ábra: A Spartan lokalizációja Rad18 $-/-$ HCT116 sejtekben.

A képen kezeletlen HCT116 WT (vad típusú) és HCT116 Rad18 $-/-$ sejtekben GFP tag-et hordozó Spartan illetve DsRed tag-et hordozó Rad18 expressziója látható. Az alsó sorban az első és a második kép egymásra vetítését a harmadik kép (Merge) mutatja be. A sejtmagok DAPI (kék) festéssel láthatók.

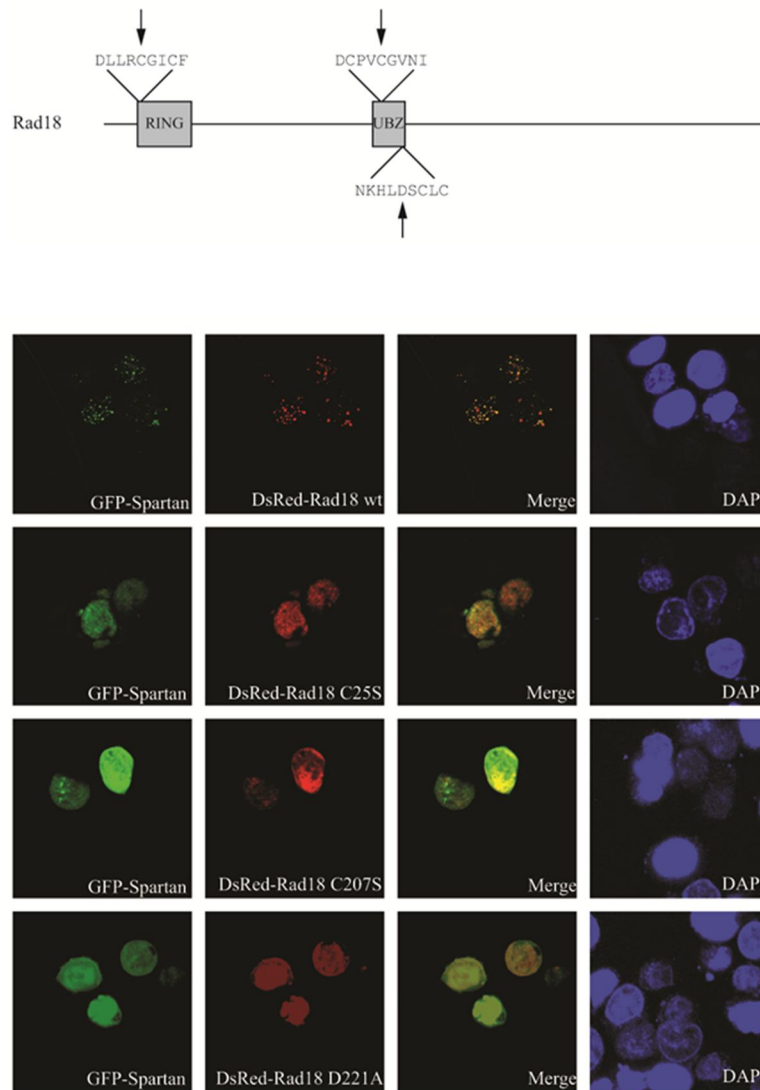
A kísérlet eredményét grafikonon ábrázoltuk, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát (19. ábra).



19. ábra: A Spartan lokalizációja HCT116 Rad18 -/- sejtekben.

Az ábrán a 18. képen látható kísérlet számszerűsített változatát mutatjuk be, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó és a transzfektált sejtek százalékos arányát. A grafikonon négy kísérlet eredményét mutatjuk be.

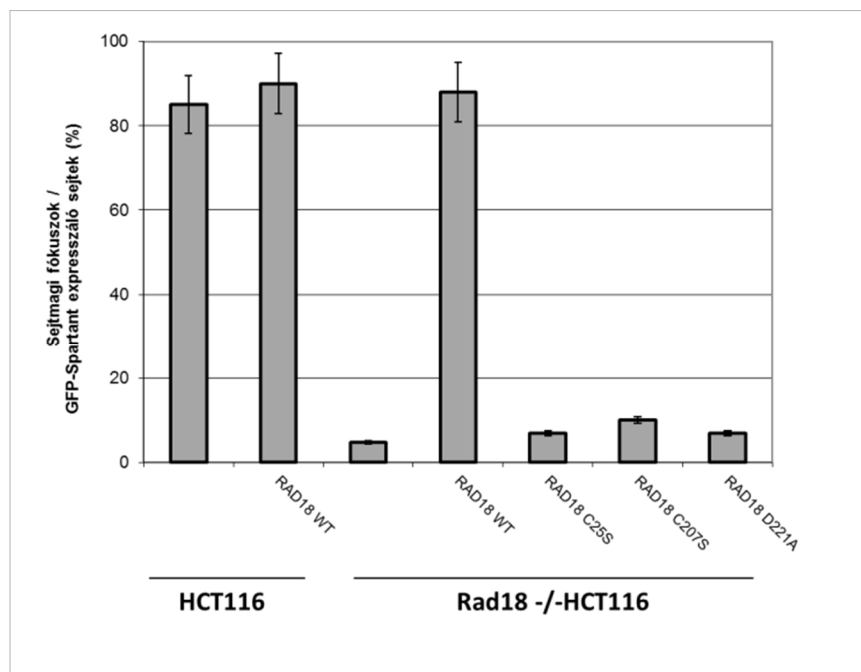
További kísérletekben vizsgáltuk, hogy a Spartan lokalizációja hogyan függ különböző Rad18 domén mutánsoktól. Megvizsgáltuk a Spartan lokalizációját a vad típusú (WT), RING (C25S), és kétféle UBZ mutáns (C207S, D221A) Rad18 mellett. A RING mutáns Rad18 nem képes ubikvitin ligáz funkcióját betölteni, az UBZ mutáns pedig nem képes ubikvitint kötni (41). A kísérletben a Rad18-/- HCT116 sejtekben kotranszfektáltuk a Spartant és a különböző Rad18 mutánsokat. Azt figyeltük meg, hogy a Spartan kolokalizációt mutatott a vad típusú Rad18-al, azonban a Rad18 RING, illetve az UBZ mutánsok mellett elveszítette lokalizációs képességét a replikációs villához, hasonlóan a Rad18-hoz (20. ábra).



20. ábra: A különböző Rad18 domének szerepe a Spartan lokalizációjában.

A képen DsRed tag-et hordozó különböző Rad18 pontmutánsok illetve a GFP tag-et hordozó Spartant expresszáló kezeltlen Rad18^{-/-} HCT116 sejtek láthatók. Az első oszlop és a második oszlop egymásra vetítését mutatja be a harmadik oszlop (Merge). A sejtmagok DAPI (kék) festéssel láthatók.

Az alábbi kísérlet eredményét grafikonon ábrázoltuk, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát a transzfektált sejtekhez viszonyítva (21.ábra).



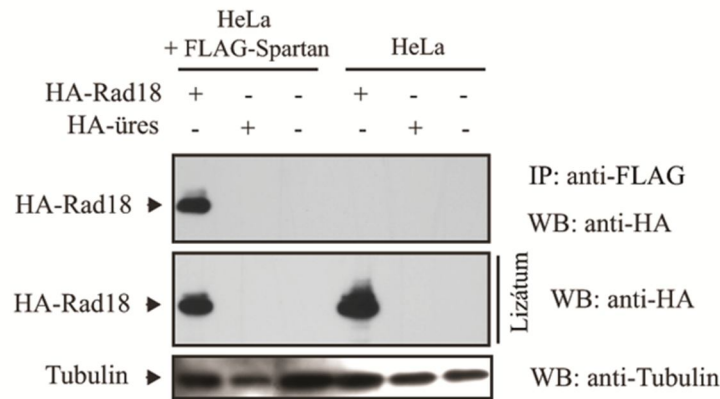
21. ábra: A különböző Rad18 domének szerepe a Spartan lokalizációjában.

A fenti kísérlet számszerűsített változata látható a grafikonon, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát a transzfektált sejtekhez viszonyítva. A kísérletben HCT116 és Rad18^{-/-}HCT116 sejteket transzfektáltunk. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

A kísérlet eredményéből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan lokalizációja függ a Rad18 jelenlététől illetve annak lokalizációjától.

V/5. A Spartan egy fehérje komplexben működik a Rad18-al

Az előző kísérletekben azt láttuk, hogy a Spartan lokalizációja függ a Rad18-tól. Ennek alapján felmerül a kérdés, hogy a Spartan egy fehérje komplexben működik-e a Rad18-al. Így *in vivo* körülmények között koimmunoprecipitációs kísérletben vizsgáltuk komplexformáló képességüket. A kísérletben FLAG-Spartant stabilan expresszáló sejteket transzfektáltunk HA tag-et hordozó Rad18 expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval. FLAG gyöngyre kötöttük a fehérjét, és anti-HA Western blot analízissel ellenőriztük a Rad18 jelenlétét. Eredményként azt figyeltük meg, hogy a Spartan *in vivo* körülmények között egy fehérje komplexben működik a Rad18-al a sejtekben (22. ábra).



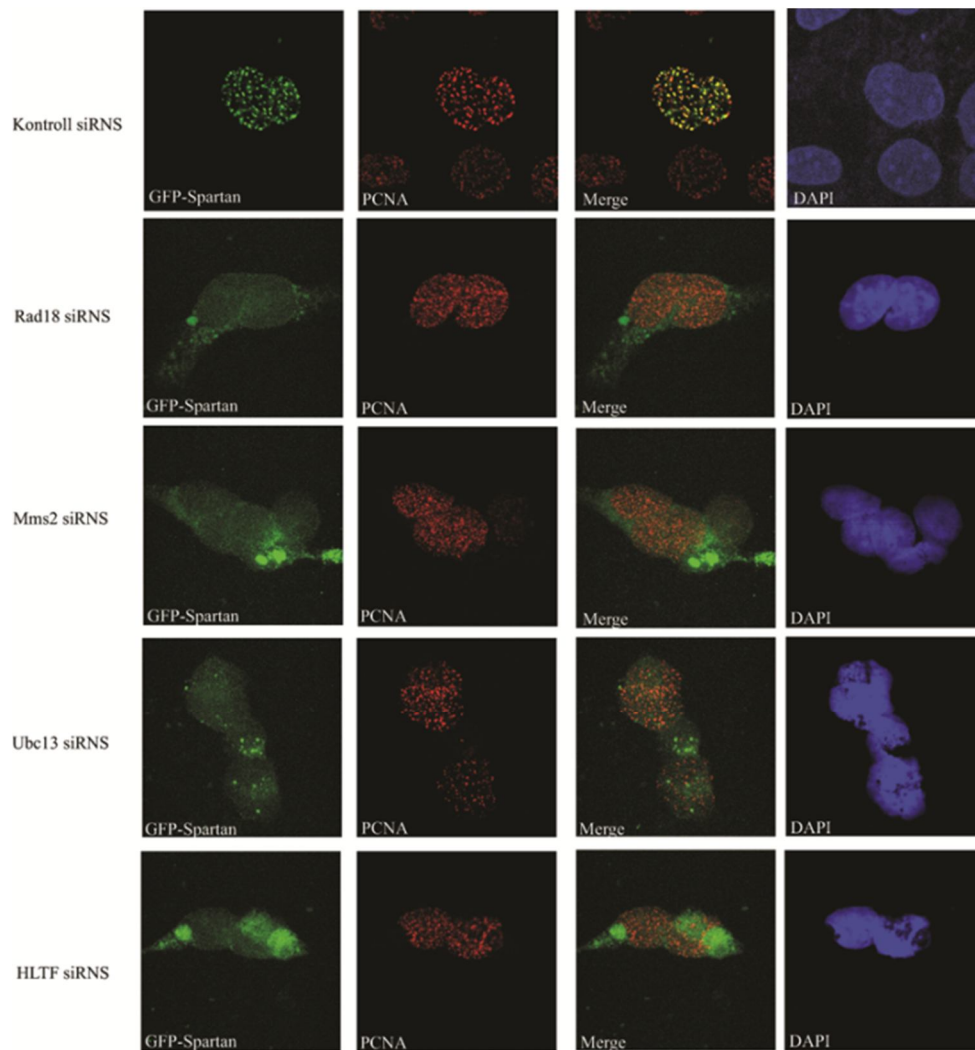
22. ábra: A Spartan és a Rad18 egy fehérje komplexben működik a sejtekben.

A kísérletben FLAG-Spartant stabilan expresszáló sejteket transzfektáltunk HA tag-et hordozó Rad18 expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval. A sejteken koimmunoprecipitációt végeztünk FLAG gyöngyön, majd Western blot analízist anti-HA illetve anti-Tubulin ellenanyagokkal.

V/6. A Spartan lokalizációja függ az ubikvitin-PCNA-tól

Az eddigi kísérletekben azt figyeltük meg, hogy a Spartan lokalizációja függ a PIP és az UBZ doménektől, amelyek feltehetően az ubikvitilált PCNA kötésért felelősek, valamint függ a Rad18 ubikvitin ligáz enzimtől. Számos DNS-hiba tolerancia útvonalban szerepet játszó fehérje, mint a pol η lokalizációja függ az ubikvitin-PCNA-tól, Rad18 függő módon (70). Ezért megvizsgáltuk, hogy a Spartan lokalizációja függ-e az ubikvitilált PCNA-tól.

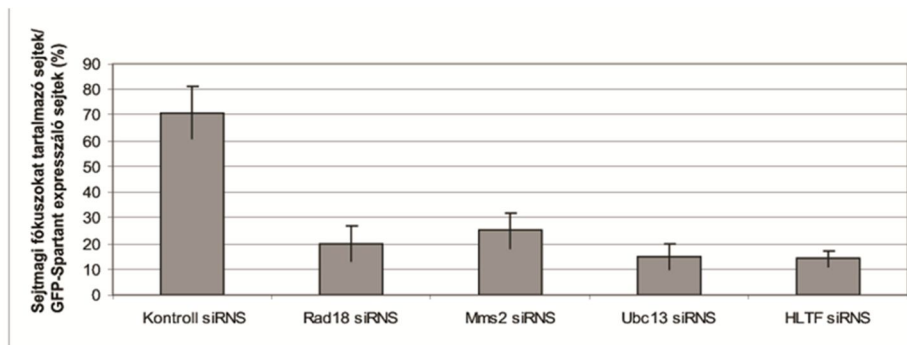
A Spartan lokalizációját vizsgáltuk olyan gének csendesítése mellett, amelyek szerepet játszanak a PCNA ubikvitilációjában. A Rad6-Rad18 által monoubikvitilált PCNA-t az Mms2-Ubc13 és HLTF fehérjék poliubikvitilálják. Ezért MMS2, UBC13 és HLTF gének csendesítése mellett megvizsgáltuk a Spartan lokalizációját HeLa sejtekben. A kísérletben a Rad18 csendesítését is vizsgáltuk, hogy megerősítsük ezzel a módszerrel is azt az eredményünket, hogy a Spartan lokalizációja függ a Rad18-tól. Ebben a kísérletben azt figyeltük meg, hogy a Spartan elveszítette kolokalizációs képességét a PCNA-vel mind Mms2, Ubc13, Rad18 és HLTF csendesítésének hatására. (23. ábra).



23. ábra: A Spartan lokalizációja a PCNA ubikvitilációjában szerepet játszó gének csendesítése mellett.

A képen GFP tag-et hordozó Spartant expresszáló kezeltlen HeLa sejtek láthatók (zöld), amelyekben mintánként különböző géneket csendesítettünk siRNS-sel, majd anti-PCNA (piros) ellenanyaggal immunfestettünk. A harmadik oszlop (Merge) az első és a második oszlop képeinek egymásra vetítését mutatja be. A sejtmagok festése DAPI-val (kék) láthatók.

A kísérlet eredményét grafikonon ábrázoltuk, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó sejtek és a Spartant expresszáló sejtek százalékos arányát (24. ábra).

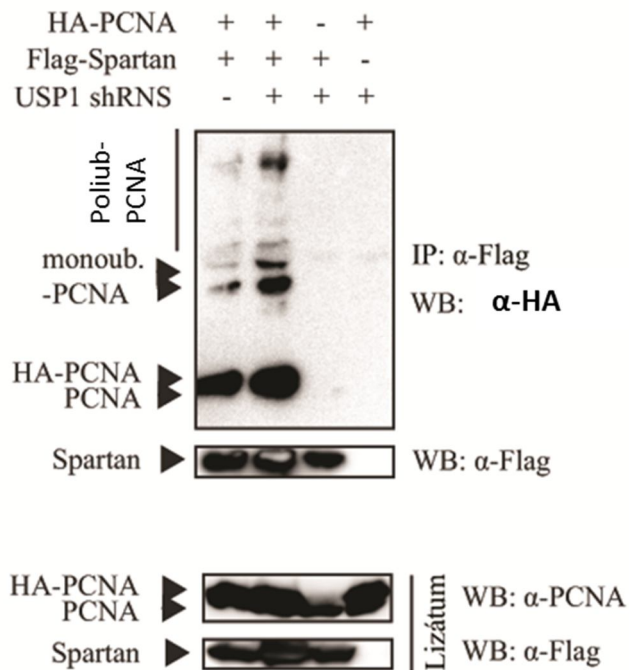


24. ábra: A Spartan lokalizációja PCNA ubikvitilációjában szerepet játszó gének csendesítése mellett.

A képen a 23. ábrán látható kísérlet számszerűsített változatát mutatjuk be, ahol meghatároztuk a Spartan sejtmagi fókuszokat tartalmazó és a transzfektált sejtek százalékos arányát. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

V/7. A Spartan egy fehérje komplexben működik az ubikvitin-PCNA-val

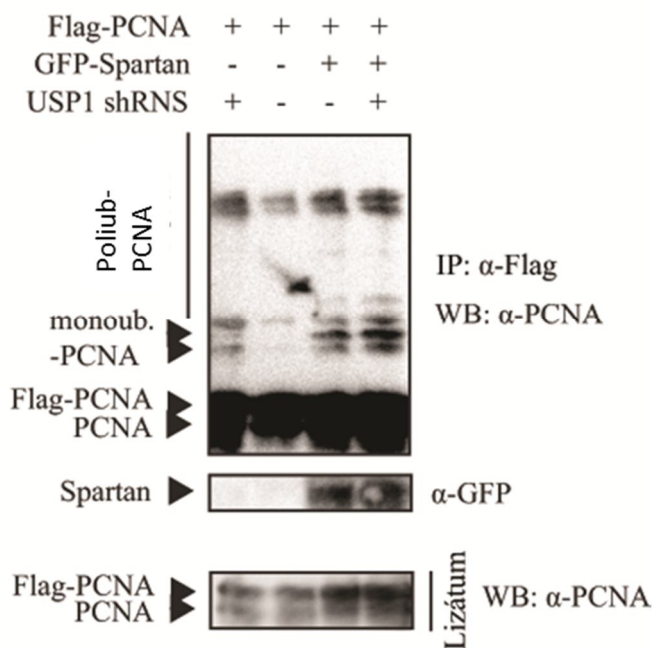
A lokalizációs kísérlet eredményei alapján, ahol azt láttuk, hogy a Spartan lokalizációja függ az ubikvitin-PCNA-tól, ezért megvizsgáltuk, hogy a Spartan egy fehérje komplexben működik-e a mono-illetve a poliubikvitin-PCNA-val. Kísérletünkben HEK293FT sejteket transzfektáltunk FLAG tag-et hordozó Spartan és HA tag-et hordozó PCNA expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval, majd immunoprecipitációt végeztünk FLAG gyöngyön. A kísérletben USP1 csendesítést alkalmaztunk, mert az USP1 deubikvitilálja a PCNA-t (71), így az USP1 gátlása mellett jobban vizsgálható a PCNA ubikvitilációja *in vivo* körülmények között. A kísérletben anti-PCNA Western blot analízis segítségével kölcsönhatást mutattunk ki a Spartan és a mono- illetve a poliubikvitin-PCNA között (25.ábra).



25. ábra: A Spartan és a poliubikvitin-PCNA egy fehérje komplexben működik a sejtekben.

A kísérletben HA tag-et hordozó PCNA-t és FLAG tag-et hordozó Spartant expresszáztattunk HEK293FT sejtekben. A kísérletben alkalmaztunk USP1 csendesítést, mivel az USP1 gátolja a poliubikvitin lánc kialakulását a PCNA-n. A sejteket UV-val (20J/m²) kezeltük, majd immunoprecipitációt végeztünk FLAG gyöngyön, végül Western blot analízist végeztünk anti-HA, anti-FLAG illetve anti-tubulin ellenanyagokkal.

Kontroll kísérletként megvizsgáltuk, hogy a Spartan expressziója és az USP1 csendesítése mellett, hogyan változik a poliubikvitin-PCNA mennyisége a sejtekben. Ezért egyes mintákban az USP1 csendesítése mellett transzfektáltunk FLAG tag-et hordozó PCNA, illetve GFP tag-et hordozó Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukciókat is. A transzfekciót követő 24 óra elteltével immunoprecipitáltunk FLAG gyöngyön, és anti-PCNA Western blot analízis segítségével mutattuk ki az ubikvitin-PCNA mennyiségét a sejtekben. A kísérletben az USP1 csendesítése mellett több ubikvitin-PCNA-t detektáltunk, azonban a Spartan túltermelés nem növelte tovább ezt az ubikvitin-PCNA mennyiségét (26. ábra).



26. ábra: Az USP1 csendesítésének hatása a PCNA poliubikvitilációjára.

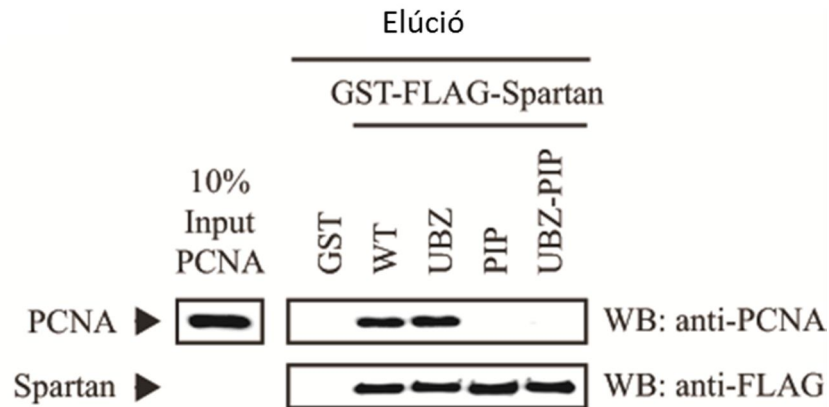
A kísérletben FLAG tag-et hordozó PCNA-t és GFP tag-et hordozó Spartant expresszáltattunk HEK293FT sejtekben. Bizonyos mintákban USP1 csendesítést alkalmaztunk. A sejteket UV-val (20J/m²) kezeltük, majd immunoprecipitációt végeztünk FLAG gyöngyön, és Western blot analízissel, anti-PCNA, anti-GFP illetve anti-tubulin ellenanyagokkal vizsgáltuk az ubikvitin-PCNA szintet.

Összességében az *in vivo* koimmunoprecipitációs kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan egy komplexben működik mind a Rad18-al mind az ubikvitin-PCNA-vel.

V/8. A Spartan közvetlen köti az ubikvitin-PCNA-t *in vitro* körülmények között

Az *in vivo* kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a Spartan komplexet képez az ubikvitin-PCNA-vel. Megerősítésként megvizsgáltuk *in vitro* körülmények között is a Spartan és az ubikvitin-PCNA közötti kölcsönhatást. Ezzel párhuzamosan azt is teszteltük, hogy melyik domén felelős az ubikvitin-PCNA kötéséért. Ezért vad típusú (WT), UBZ, PIP, és UBZ-PIP kettős mutáns és PCNA illetve ubikvitin-PCNA tisztított fehérjékkel GST pull-down kísérleteket készítettünk.

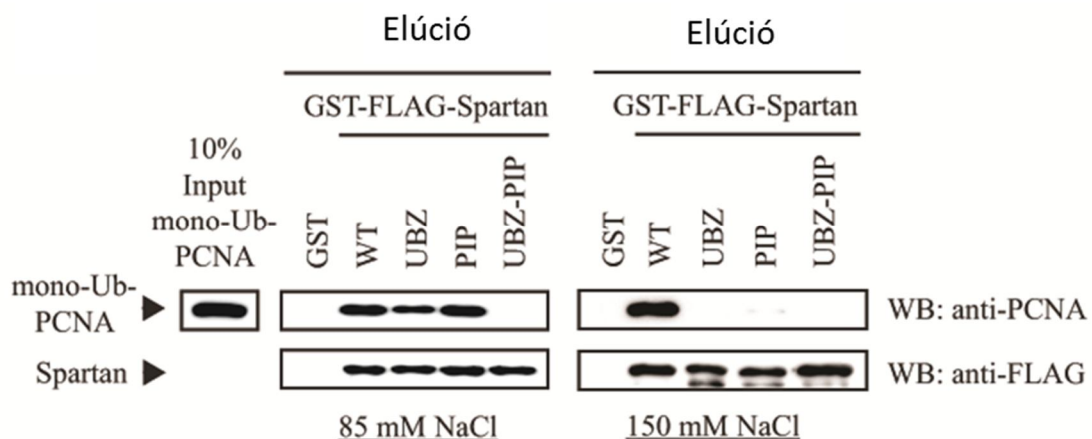
Először azt teszteltük, hogy a Spartan kölcsönhat-e a PCNA-vel. Azt figyeltük meg, hogy a vad típusú és az UBZ pontmutáns Spartan képes kötni a PCNA-t, ellentétben a PIP pontmutánsal (27. ábra). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan a módosíthatatlan PCNA-t a PIP doménjén keresztül képes kötni.



27. ábra: A Spartan kölcsönhat a PCNA-vel *in vitro* körülmények között.

A kísérletben élesztőből tisztított fehérjéket, GST, PCNA, vad típusú (WT), UBZ, PIP és UBZ-PIP kettős mutáns Spartant használtunk. A fehérjékkel *in vitro* GST pull-down kísérletet végeztünk, majd Western blot analízist készítettünk anti-PCNA és anti-FLAG ellenanyaggal.

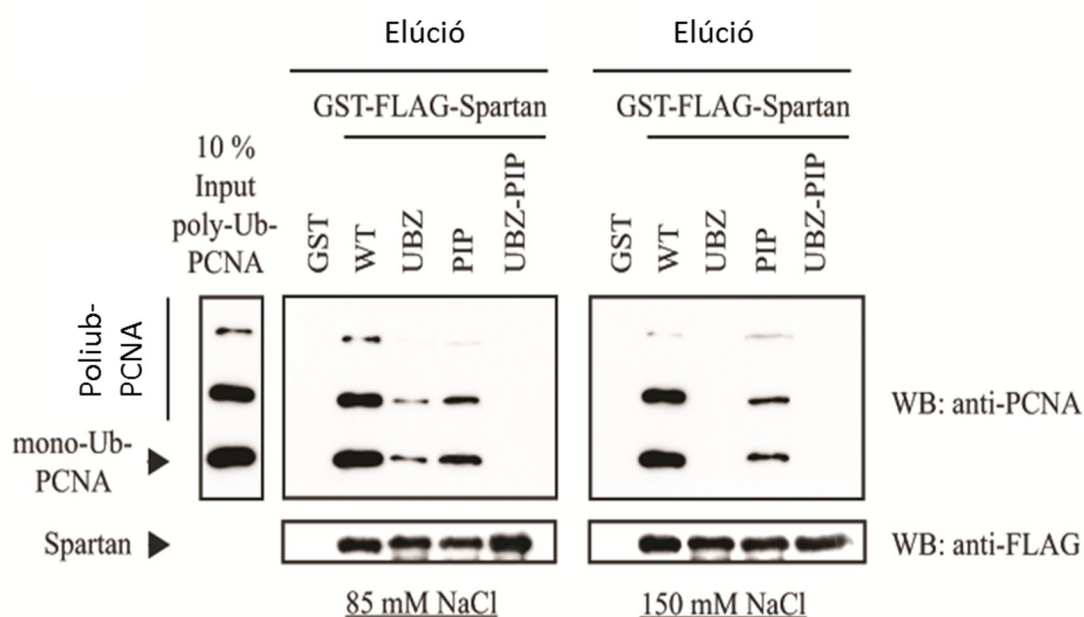
Hasonló kísérleti elrendezésben megvizsgáltuk a Spartan és a monoubikvitin-PCNA közötti kölcsönhatást. A kölcsönhatás erősségét különböző sókoncentráció mellett vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy alacsonyabb sókoncentrációnál, 85mM NaCl mellett a vad típusú (WT), az UBZ, a PIP pontmutáns Spartan köti a monoubikvitin-PCNA-t, ellentétben a PIP-UBZ kettős mutánssal. Azonban magasabb, 150 mM NaCl mellett csak a vad típusú (WT) Spartan lépett kölcsönhatásba a monoubikvitin-PCNA-vel (28. ábra).



28. ábra: A Spartan kölcsönhat a monoubikvitin-PCNA-vel *in vitro* körülmények között.

A kísérletben tisztított fehérjéket, GST, monoubikvitin-PCNA, vad típusú (WT), UBZ, PIP és UBZ-PIP kettős mutáns Spartant használtunk. GST *in vitro* pull-down kísérletet készítettünk, majd Western blot analízist végeztünk anti-PCNA és anti-Flag ellenanyaggal.

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a Spartan kölcsönhat-e a poliubikvitin-PCNA-val *in vitro* körülmények között. Ezért hasonlóan az előző kísérlethez, GST pull-down kísérletet végeztünk, ugyanakkor ebben az esetben tisztított poliubikvitin-PCNA-t használtunk. A kísérletben azt tapasztaltuk, hogy alacsonyabb, 85 mM NaCl mellett a vad típusú (WT) Spartan képes kötni a poliubikvitin-PCNA-t, azonban az UBZ és PIP pontmutáns gyengébben, míg az UBZ-PIP kettős pontmutáns nem köti. Magasabb, 150 mM NaCl mellett pedig azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú Spartan megőrizte kölcsönható képességét. A PIP mutáns kötő képességének erőssége csökkent, míg az UBZ és UBZ-PIP nem volt képes a poliubikvitin-PCNA kötésére (29. ábra).



29. ábra: A Spartan kölcsönhat a poliubikvitin-PCNA-val *in vitro* körülmények között.

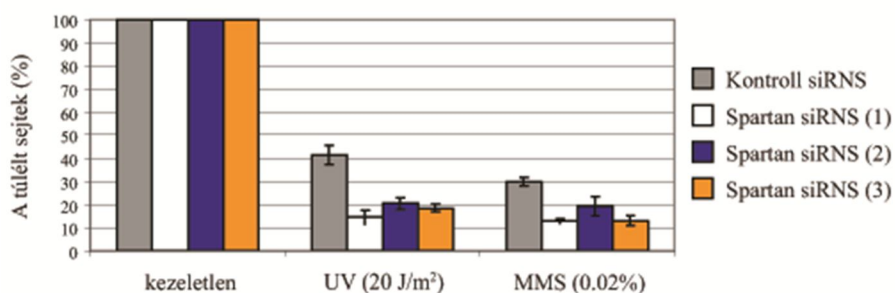
A kísérletben tisztított fehérjéket, GST, poliubikvitin-PCNA, vad típusú (WT), UBZ, PIP és UBZ-PIP kettős mutáns Spartant használtunk. GST pull down kísérletet végeztünk, majd Western blot analízist készítettünk anti-PCNA és anti-FLAG ellenanyaggal.

Az *in vitro* kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan PIP doménjén keresztül képes kötni a PCNA-t, UBZ doménjén keresztül az ubikvitin láncot a PCNA-n és preferenciálisan az ubikvitin-PCNA-val hat köcsön.

V/9. A Spartan csendesített emberi sejtek érzékenységet mutatnak DNS károsító ágensekkel szemben

Korábban kimutattuk, hogy a Spartan a Rad18 által kijelölt, megállt replikációs villához lokalizál, valamint képes kötni az ubikvitin-PCNA-t. A Spartan lokalizációja függ a Rad18-tól, azzal fehérjekomplexet képez. A Rad18 csendesítése, illetve a PCNA ubikvitiláció hiánya a sejtek megnövekedett érzékenységét okozza DNS károsító ágensekkel szemben, mint UV és MMS (72,73). Mivel eddigi kísérletek azt sugallták, hogy a Spartan a Rad18 csoportba tartozik, megvizsgáltuk, hogy a Spartan csendesítése az emberi sejteket érzékenyíti-e DNS károsító ágensekre, valamint hogy mi az egyes doménjeinek szerepe ebben.

A nem specifikus géncsökkentés elkerülése érdekében három különböző target szekvenciájú siRNS-sel csendesítettük a Spartant. Ezeket az siRNS-sel transzfektált sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló sejtekkel 3:1 arányban, majd kezeltük különböző DNS károsító ágensekkel, mint UV sugárzással (20J/m²) és MMS-sel (0,02%). A sejtek hét napos növesztése után meghatároztuk a GFP-t expresszáló és nem expresszáló sejtek arányát, amelyből következtethetünk a sejtek túlélésére. A kezeltetlen mintákban mért értéket vettük 100%-nak, és ehhez viszonyítottuk az adott DNS károsító ágens mellett mért értéket. A kísérlet során azt figyeltük meg, hogy a Spartan csendesített sejtek nagyfokú érzékenységet mutattak, mind UV, mind MMS kezelés hatására (30. ábra).

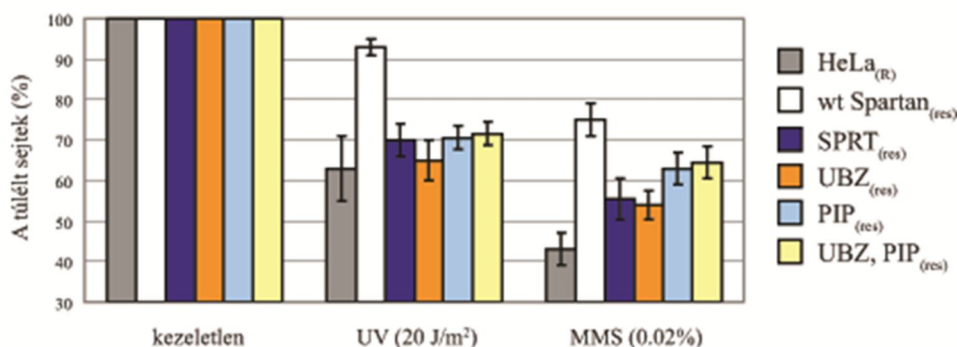


30. ábra: A Spartan csendesített emberi sejtek érzékenysége DNS károsító ágensekkel szemben.

A kísérletben három különböző siRNS-sel (1,2,3) transzfektáltunk HeLa sejteket. A sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló és nem expresszáló sejtekkel, majd kezeltük DNS károsító ágensekkel. A sejteket hét napon keresztül növesztettük, majd meghatároztuk a GFP-t expresszáló és nem expresszáló sejtek arányát áramlási citométer segítségével. Az adatokból következtettünk a sejtek túlélésére. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy melyik domén mutációja okozhatja a DNS károsító ágensekkel szembeni érzékenységét. Ezért shRNS segítségével Spartant stabilan csendesített sejtvonalat hoztunk létre. Ebben a sejtvonalba tranziensen transzfektáltunk FLAG tag-et

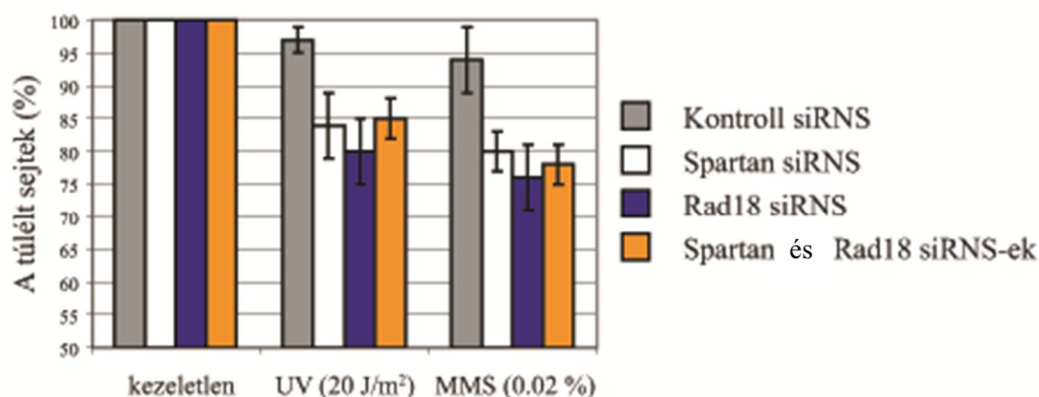
hordozó, különböző Spartan domén pontmutáns és shRNS rezisztens változatok expresszióját biztosító plazmid konstrukciókat. A transzfekciót követően a sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló sejtekkel, majd DNS károsító ágensekkel kezeltünk. Azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú (WT) Spartan képes volt nagy mértékben komplementálni a Spartan csendesítése okozta érzékenységet, míg az egyes doménekben pontmutáns konstruktok, így az UBZ, SprT, PIP, UBZ-PIP csak részlegesen (31. ábra).



31. ábra: A Spartan csendesített emberi sejtek érzékenysége DNS károsító ágensekkel szemben.

A kísérletben FLAG tag-et hordozó shRNS rezisztens, valamint különböző doménekben pontmutáns Spartan expresszióját biztosítottuk. A transzfektált sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló és nem expresszáló sejtekkel, majd kezeltük DNS károsító ágensekkel. A sejteket hét napon keresztül növesztettük, majd meghatároztuk a GFP-t expresszáló és nem expresszáló sejtek arányát áramlási citométer segítségével. Az adatokból következtettünk a sejtek túlélésére. A képen négy kísérlet eredményét mutatjuk be.

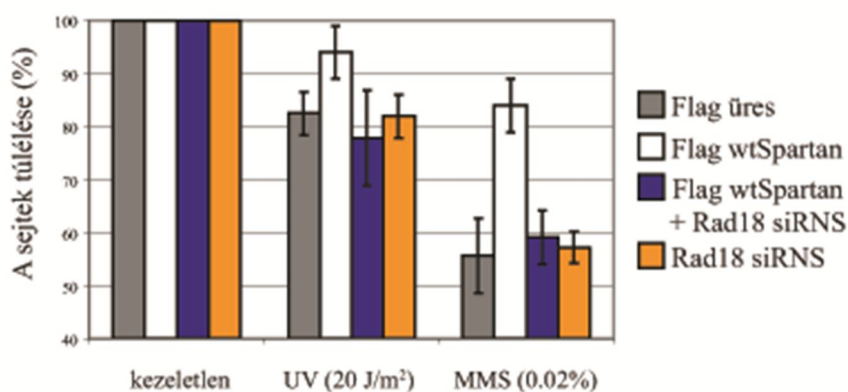
Ezután megvizsgáltuk, hogy a Spartan valóban a Rad18-al egy útvonalban játszik-e szerepet. Ennek bizonyítására a Spartant és a Rad18-at külön-külön, illetve egyszerre csendesítettük a sejtekben, majd meghatároztuk a sejtek túlélési arányát DNS károsító ágensekkel szemben. A kísérletben azt figyeltük meg, hogy a kettős csendesített sejtek a Spartan csendesített sejtekhez hasonló érzékenységet mutattak DNS károsító ágensekkel szemben. Így arra következtettünk, hogy a Rad18 és a Spartan egy DNS-hiba javító útvonalban játszanak szerepet. (32. ábra).



32. ábra: A Spartan és a Rad18 csendesítésének hatása HeLa sejtekben

A kísérletben HeLa sejtekben Spartan, Rad18 és Spartan-Rad18 siRNS-ket transzfektáltunk. A sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló és nem expresszáló sejtekkel, majd kezeltük DNS károsító ágensekkel. A sejteket hét napon keresztül növesztettük, majd meghatároztuk a GFP-t expresszáló és nem expresszáló sejtek arányát áramlási citométer segítségével. Az adatokból következtettünk a sejtek túlélésére. A képen négy kísérlet eredményét mutatjuk be.

Az eredményt másik kísérleti elrendezésben is terveztük megerősíteni. Ezért érzékenységi kísérletben vizsgáltuk a Rad18 csendesítésének hatását a Spartan csendesített sejtvonalon. Kontrollként a Spartant menekítettük a Spartan expresszáltatásával. Ebben a kísérleti elrendezésben, hasonlóan az előző kísérlethez, azt figyeltük meg, hogy a Spartan csendesített sejtek hasonló érzékenységet mutattak DNS károsító ágensekkel szemben, mint a Spartan-Rad18 kettős csendesített sejtek (33.ábra).



33. ábra: A Spartan csendesített emberi sejtek érzékenysége DNS károsító ágensekkel szemben.

A Spartant stabilan csendesítő sejtvonalat transzfektáltuk Rad18 siRNS-sel illetve FLAG tag-et hordozó shRNS rezisztens Spartan plazmid konstrukcióval. A sejteket kevertük GFP-t stabilan expresszáló és nem expresszáló sejtekkel, majd kezeltük DNS károsító ágensekkel. A sejteket hét napon keresztül növesztettük, majd meghatároztuk a GFP-t expresszáló és nem expresszáló sejtek arányát áramlási citométer segítségével. Az adatokból következtettünk a sejtek túlélésére. A képen négy kísérlet eredményét mutatjuk be.

A sejt túlélési kísérletek eredményeként azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan csendesítése fokozott érzékenységet okozta a sejteknek DNS károsító ágensekkel szemben. Azt is megállapítottuk, hogy a Rad18 és a Spartan azonos DNS-hiba javítási útvonalban játszik szerepet.

V/10. A Spartan csendesítése fokozza a testvér kromatidák közötti átkereszteződések számát

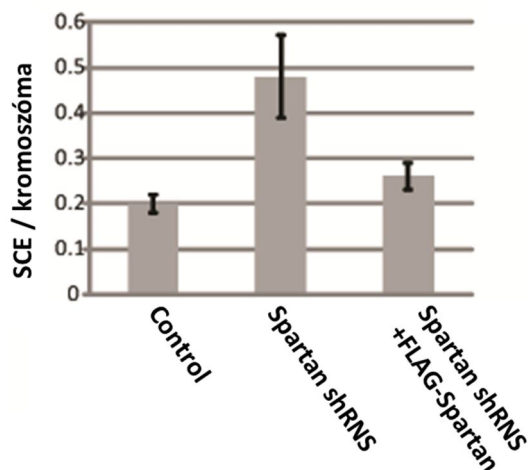
A Rad18 függő DNS-hiba tolerancia útvonal és a homológ rekombináció alternatív módon képes a megállt replikációs villa mentésére (74). Kimutatták, hogy a Rad18 csendesítése a sejtekben megnöveli a testvér kromatidák közötti átkereszteződések számát (75).

Az előző kísérletek eredményeként azt állapítottuk meg, hogy a Spartan a Rad18 csoport egy tagja. A megállapítás megerősítése érdekében megvizsgáltuk, hogy a Spartan csendesítése hasonlóan a Rad18 csendesítéséhez fokozott testvér kromatidák közötti kicserélődést okoz-e. Kísérletünkben a Spartan csendesített stabil sejtekben a testvér kromatidák közötti kicserélődések száma megnövekedett. Abban a mintában, amelyben menekítettük a Spartant, kevesebb volt az átcserélődések száma (36. és 37. ábrák). Ezzel a kísérlettel is megerősítettük, hogy a Spartan a Rad18 útvonalban játszik szerepet.



36. ábra: Testvér kromatidák közötti kicserélődések a Spartan csendesített sejtekben.

A kép a Spartant stabilan csendesítő HeLa sejteken végzett SCE (Sister Chromatid Exchange) kísérlet eredményét mutatja be. A kromoszómákat akridin narancs festékkel festettük. A nyilak mutatják az átkereszteződések helyét.



37. ábra: A testvér kromatidák közötti kicserélődés átlagos száma kromoszómánként.

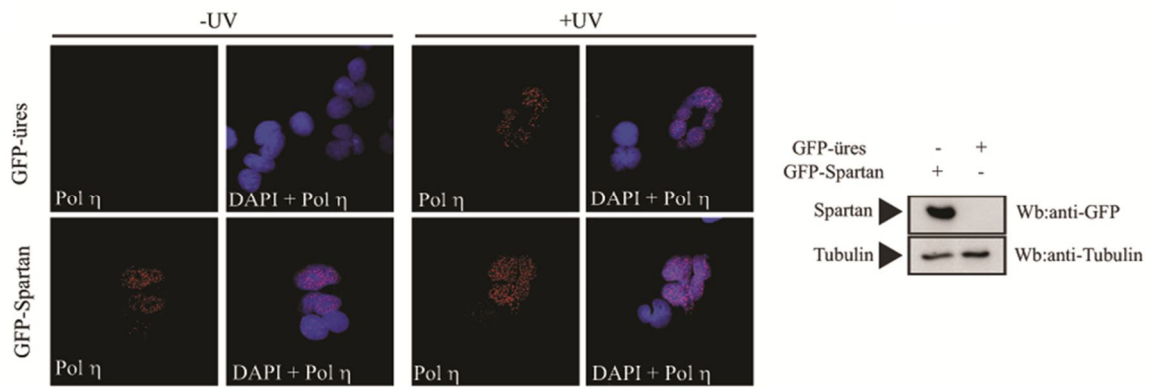
A képen a 36. ábra grafikus ábrázolása látható, ahol meghatároztuk a testvér kromatidák közötti kicserélődések (SCE) egy kromoszómára eső átlagos számát. A képen öt kísérlet eredményét mutatjuk be.

V/11. A Spartan stimulálja a polη replikációs villához történő lokalizációját.

Az előző kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan a Rad6-Rad18 csoportba tartozik, valamint kölcsönhat az ubikvitin-PCNA-val. Az ubikvitin-PCNA szabályozza a megakadt replikációs villánál a polimeráz váltást, ezzel a TLS szintézis elindulását (13,44,76,77). Mivel a Spartan köti az ubikvitin-PCNA-t, feltételeztük, hogy stimulálja a TLS-t. Ennek vizsgálatára a Polη TLS polimerázt választottuk markerként.

A polη-t stabilan expresszáló sejtvonalban a polη homogén eloszlást mutat a sejtmagban, azonban UV kezelést követően három óra elteltével a replikációs villához lokalizál(78,79).

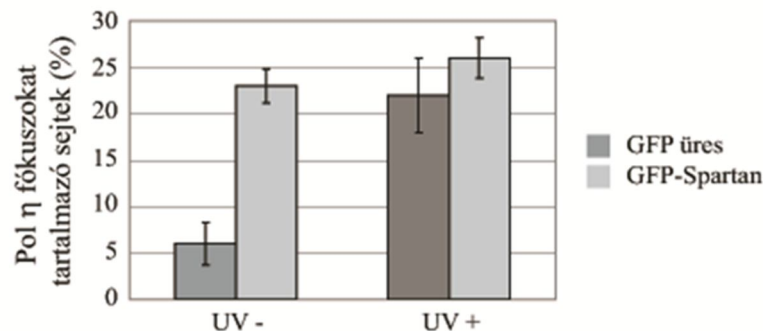
A kísérlethez FLAG tag-et hordozó polη stabil expresszióját biztosító HeLa sejtvonalat készítettünk. Ezt a stabil sejtvonalat ellenőriztük, amelynek eredményeként az irodalmi adatoknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a kezeltlen sejtvonalban a polη homogén eloszlást mutat a sejtmagban. UV (20J/m²) kezelés után három óra elteltével pedig sejtmagi fókuszokat alkot, amelyek kijelölik az elakadt replikációs villát. A kísérlet során ezt a sejtvonalat transzfektáltuk GFP tag-et hordozó Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval, majd UV (20J/m²) kezelés után három óra elteltével anti-FLAG immunfestéssel ellenőriztük a polη lokalizációját a sejtmagban. A Spartan expresszióját anti-GFP Western blot analízissel mutattuk ki. A kísérletünkben a polη már UV kezelés nélkül is képes volt fókuszformálásra a Spartan túlexpresszáltatása mellett (38. ábra).



38. ábra: A pol η lokalizációjának változása Spartan hatására.

A képen FLAG tag-et hordozó pol η -t stabilan expresszáló HeLa sejt vonal látható. A sejteket GFP tag-et hordozó Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval illetve GFP-üres vektorral transzfektáltuk. A sejteket UV (20J/m²) sugárzással kezeltük, majd a kezelés után három óra elteltével a sejteket immunfestettük anti-FLAG ellenanyaggal. Ezzel párhuzamosan a sejtek egy részével Western blot analízist végeztünk anti-GFP ellenanyaggal, amellyel a Spartan expresszióját követtük nyomon.

A kísérlet eredményét grafikonon ábrázoltuk, ahol a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát mutatjuk be (39. ábra).

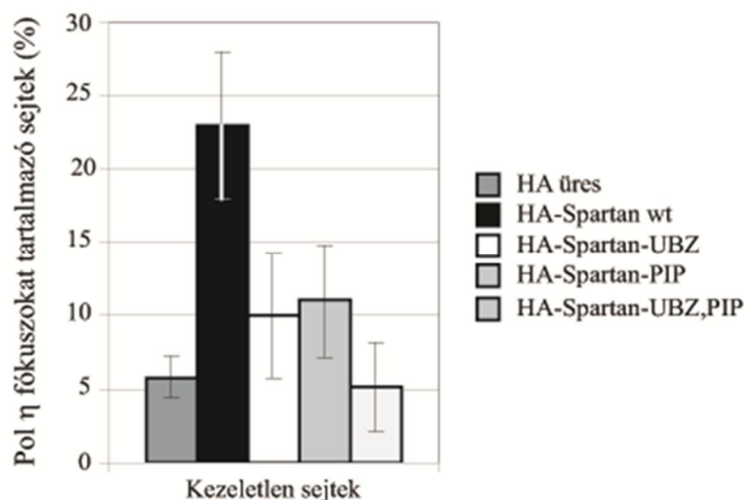


39. ábra: A pol η lokalizációjának változása Spartan hatására.

A képen a 38. ábra számszerűsített változata látható, ahol meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát kezeletlen illetve kezelt sejtekben. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

A következő kérdés az volt, hogy a Spartan doménjei szerepet játszanak-e a pol η lokalizációjának stimulációjában. Ezért megvizsgáltuk az UBZ, a PIP és az UBZ-PIP kettős pontmutánsok hatását a pol η fókuszformáló képességére. Az előző kísérlethez hasonlóan a FLAG-pol η -t stabilan expresszáló HeLa sejt vonalat transzfektáltuk HA tag-et hordozó különböző pontmutáns Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval. Azt figyeltük meg, hogy a kezeletlen sejtekben az UBZ, a PIP illetve az UBZ-PIP Spartan pontmutánsok egyike sem volt képes stimulálni a pol η fókuszformáló képességét a vad típushoz hasonló

mértékben. A kísérlet eredményét a 38. ábra mutatja be. Az előzőhöz hasonlóan meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát.



38. ábra: A pol η lokalizációjának változása Spartan UBZ, PIP illetve UBZ-PIP pontmutánsok hatására.

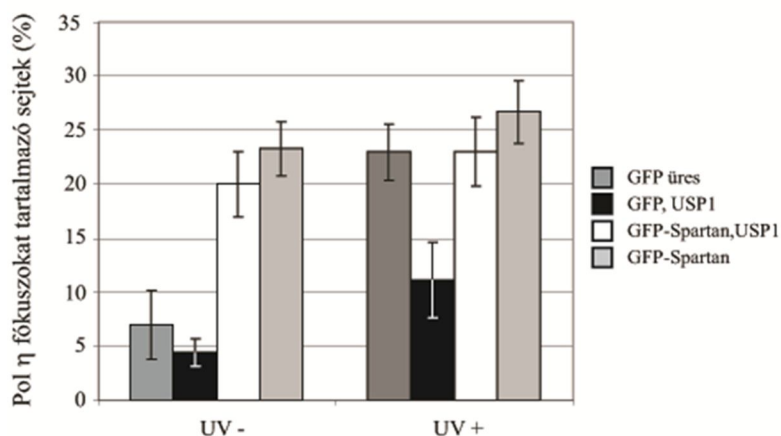
A kísérletben FLAG tag-et hordozó pol η stabil expresszióját biztosító HeLa sejt vonalat transzfektáltunk HA tag-et hordozó vad típusú (WT), UBZ, PIP, UBZ-PIP Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval illetve HA-üres vektorral. A sejteket immunfestettük anti-FLAG ellenanyaggal. A kísérlet eredményét mutatja be az alábbi grafikon, ahol meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

A kísérlet eredményeinek tükrében azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan stimulálja a pol η replikációs villához történő lokalizációját, és az UBZ és PIP domének elengedhetetlenek a Spartan ezen funkciójának betöltésében.

V/12. A Spartan gátolja az USP1 TLS gátló hatását

Az USP1 deubikvitiláz enzim szabályozza az ubikvitin-PCNA féléletidejét. Ezért az USP1 fokozott expressziója a sejtekben az ubikvitin-PCNA deubikvitilálását eredményezi, amelynek következtében gátolja a TLS-t, esetünkben a pol η fókuszformáló képességét. Az eddigi kísérleteink alapján azt feltételezzük, hogy mivel a Spartan kölcsönhat az ubikvitin-PCNA-val, és stimulálja a pol η fókuszformálását, ezért képes lehet megvédeni az ubikvitin-PCNA-t az USP1 deubikvitiláló hatásától. Ezért kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy az USP1 deubikvitiláló hatását képes-e akadályozni a Spartan fokozott expressziója a sejtekben. A kísérlet során a pol η -t stabilan expresszáló HeLa sejt vonalat transzfektáltuk az USP1 valamint a Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukciókkal. UV (20J/m²) kezelés után három

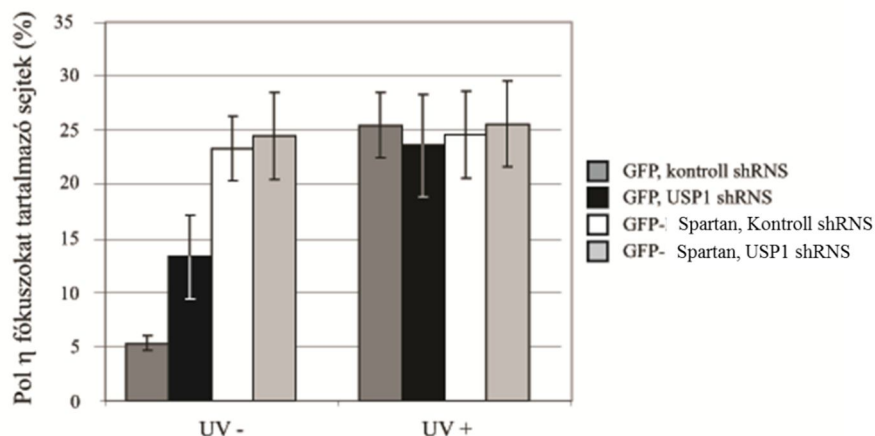
órával a sejteket immunfestettük anti-FLAG ellenanyaggal, és meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát. A kísérlet eredményét a (41. ábra) mutatja be. Megfigyeltük, hogy a kezeletlen és kezelt sejtekben az előző kísérletekhez hasonlóan a Spartan fokozott expresszálatása a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek számát növelte, míg az USP1 csökkentette. Azonban abban a mintában, ahol mindkettő, vagyis az USP1-t és a Spartant is fokozottan expresszáltattuk, ott az USP1 nem volt képes csökkenteni a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek számát.



41. ábra: A pol η lokalizációjának változása Spartan és USP1 fokozott expresszálatásának hatására.

A kísérletben FLAG tag-et hordozó pol η stabil expresszióját biztosító HeLa sejt vonalat transzfektáltuk GFP tag-et hordozó vad típusú Spartan, valamint az USP1 expresszióját biztosító plazmid konstrukciókkal. A sejteket UV (20J/m²) sugárzással kezeltük, majd a kezelés után három óra elteltével immunfestettük anti-FLAG ellenanyaggal. A kísérlet eredményét mutatja be az alábbi grafikon, ahol meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

A következő kontroll kísérletben megvizsgáltuk az USP1 csendesítésének hatását a Spartan fokozott expresszálatása mellett a pol η fókuszformáló képességére. Ebben a kísérletben az előzőekhez hasonlóan a pol η -t stabilan expresszáló HeLa sejt vonalban shRNS segítségével csendesítettük az USP1-et, és párhuzamosan transzfektáltuk a sejteket a Spartan expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval, majd meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy az USP1 csendesítése következtében megnövekedett a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek száma, a Spartan fokozott expressziójának viszont nem volt további hatása (42. ábra).



42. ábra: A pol η lokalizációjának változása Spartan fokozott expresszáltatása és USP1 csendesítésének hatására.

A kísérletben FLAG tag-et hordozó pol η stabil expresszióját biztosító HeLa sejtvonalat transzfektáltuk GFP tag-et hordozó vad típusú Spartan, valamint USP1 csendesítését biztosító plazmid konstrukcióval. A sejteket UV (20J/m²) sugárzással kezeltük, majd a kezelés után három óra elteltével a sejteket immunfestettük anti-FLAG ellenanyaggal. A kísérlet eredményét mutatja be az alábbi grafikon, ahol meghatároztuk a pol η fókuszokat tartalmazó sejtek százalékos arányát. A képen három kísérlet eredményét mutatjuk be.

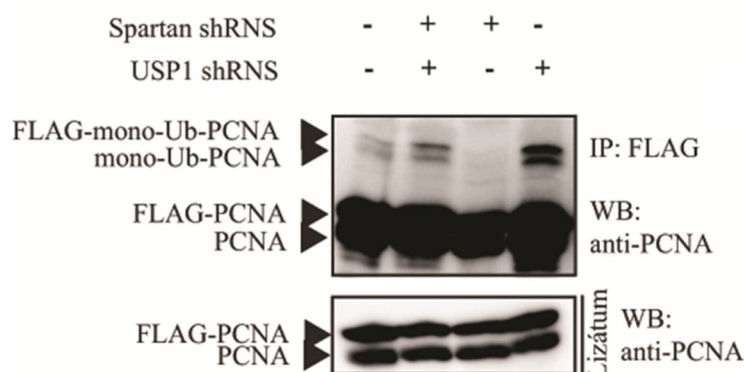
A kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan az ubikvitin-PCNA kötésével képes védeni az USP1 deubikvitiláló hatásától, ezáltal stimulálja a pol η fókuszformáló képességét.

V/13. A Spartan gátolja az ubikvitin-PCNA-n az USP1 függő deubikvitilációját *in vivo* körülmények között

Az *in vivo* lokalizációs kísérletek után, ahol kimutattuk, hogy a Spartan stimulálja a pol η fókuszformáló képességét, azt feltételeztük, hogy a Spartan védi az ubikvitin-PCNA-t az USP1 hatásától. A hipotézis tesztelésére megvizsgáltuk, hogy *in vivo* körülmények között hogyan változik az ubikvitin-PCNA mennyisége a sejtekben a Spartan expressziós szintjének változása mellett.

Kísérleteinkben shRNS segítségével csendesítettük a Spartant, az USP1-et illetve a kettőt egyszerre. Minden mintában transzfektáltuk a FLAG tag-et hordozó PCNA expresszióját biztosító plazmid konstrukciót. A kísérlet során FLAG gyöngyön immunoprecipitációt végeztünk, ahol a PCNA-t és annak ubikvitilált formáját kötöttük fel a gyöngyre, és anti-PCNA Western blot analízis segítségével határoztuk meg az ubikvitin-PCNA mennyiségét. A sejtek UV kezelése stimulálja a PCNA ubikvitilációját, ezért a transzfektált sejteket UV fénnel (20J/m²) kezeltük. A sejteket a kezelés után három óra elteltével tártuk fel lízis

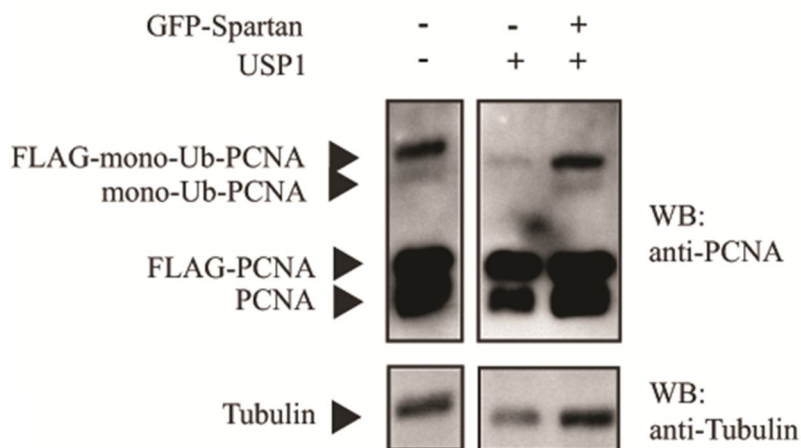
pufferben. A kísérlelben megfigyeltük, hogy az USP1 csendesítése hatására növekedett, míg a Spartan csendesítés hatására csökkent az ubikvitin-PCNA mennyisége a sejtekben a kontroll mintához képest (43. ábra).



43. ábra: A Spartan és az USP1 csendesítésének hatása az ubikvitin- PCNA mennyiségére.

A kísérletben USP1 illetve Spartan csendesítését, illetve FLAG tag-et hordozó PCNA expresszióját biztosító plazmid konstrukciókkal transzfektáltuk a sejteket. A sejteket UV (20J/m²) sugárzással kezeltük, majd a kezelés után három óra elteltével, immunoprecipitációt végeztünk FLAG gyöngyön. A kísérlet eredményét Western blot analízissel, anti-PCNA ellenanyaggal ellenőriztük, amely feltárta az ubikvitin-PCNA mennyiségét a sejtekben. A sejtizátum mennyiségét anti-tubulin ellenanyaggal követtük nyomon.

A következő kísérletben azt vizsgáltuk meg, hogy a Spartan és az USP1 fokozott expressziójának hatására hogyan változik az ubikvitin-PCNA mennyisége a sejtekben. Ezért HEK293FT sejteket kotranszfektáltunk Spartan, USP1 illetve PCNA expresszióját biztosító plazmid konstrukciókkal. A sejteket az előző kísérlethez hasonlóan kezeltük UV (20J/m²) sugárzással, majd anti-PCNA Western blot segítségével határoztuk meg az ubikvitin-PCNA mennyiségét a sejtekben. Kísérletben azt láttuk, hogy az USP1 csökkentette az ubikvitin-PCNA mennyiségét, azonban a Spartan jelenléte megvédte az ubikvitin-PCNA-t az USP1 deubikvitiláló hatásától (44. ábra).



44. ábra: A Spartan és az USP1 fokozott expressziójának hatása az ubikvitin- PCNA mennyiségére.

A kísérletben USP1, Spartan illetve FLAG tag-et hordozó PCNA expresszióját biztosító plazmid konstrukcióval transzfektáltuk a sejteket. A sejteket UV (20J/m²) sugárzással kezeltük, majd a kezelés után három óra elteltével SDS pufferben tártuk fel. A kísérlet eredményét Western blot analízissel ellenőriztük, anti-PCNA ellenanyaggal. Így határoztuk meg az ubikvitin-PCNA mennyiségét a sejtekben. A sejtlizátum mennyiségét anti-tubulin ellenanyaggal követtük nyomon.

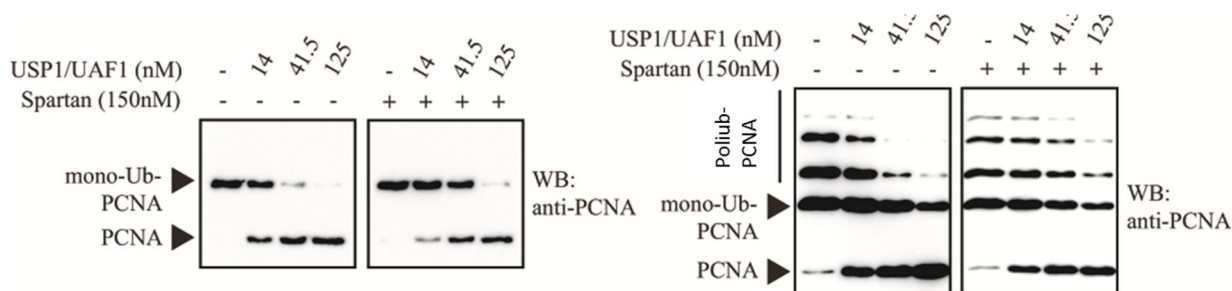
A kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan védi az ubikvitin-PCNA-t az USP1 deubikvitiláló hatásától, így utat enged a TLS-nek.

V/14. A Spartan gátolja az USP1/UAF1 függő PCNA deubikvitilációt *in vitro* körülmények között.

Az *in vivo* kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a Spartan védi az ubikvitilált PCNA-t. Ezt az eredményt *in vitro* kísérletekkel is megpróbáltuk alátámasztani.

Az USP1 aktivitását az UAF1 fokozza, ezért az *in vitro* kísérletekben tisztított USP1/UAF1 komplexeket használtunk.

Először megvizsgáltuk az USP1/UAF1 komplex deubikvitiláló aktivitását a monoubikvitin- illetve poliubikvitin-PCNA-n. A kísérlet eredményét a 45.ábra mutatja be. Az USP1/UAF1 fehérjekomplex növekvő koncentrációja mellett nőtt a deubikvitiláló hatás, mind a monoubikvitin- mind a poliubikvitin-PCNA-n. A Spartan a koncentráció növekedésének függvényében növekedő mértékben gátolta az USP1 deubikvitiláló hatását.

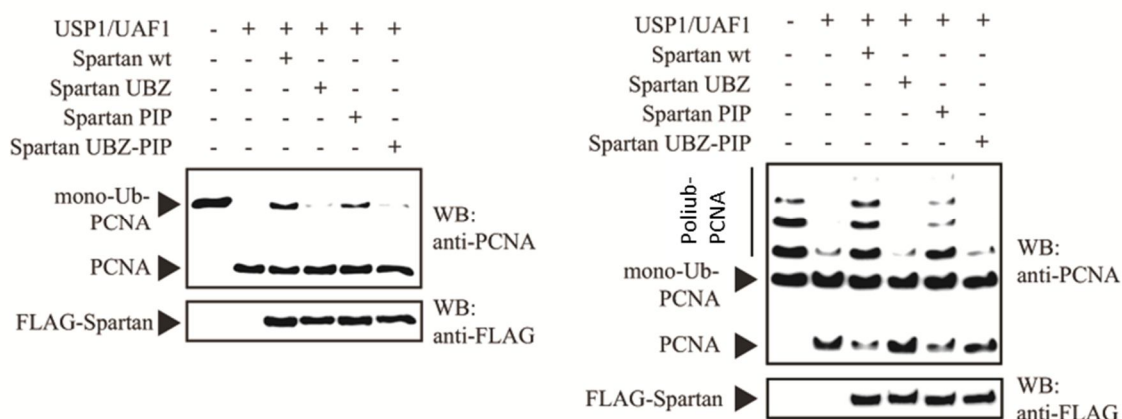


45.ábra: A Spartan gátolja az USP1/UAF1 deubikvitiláló funkcióját.

A kísérletben tisztított USP1/UAF1 komplexet, Spartant és mono-ubikvitin-illetve poli-ubikvitin-PCNA fehérjéket inkubáltunk. A kísérlet eredményét Western blot analízissel, anti-PCNA ellenanyaggal ellenőriztük.

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a Spartan doménjei milyen szerepet töltenek be az USP1 hatása elleni védelemben. Így a kísérletben tisztított UBZ, PIP és UBZ-PIP mutáns Spartan fehérjéket inkubáltunk USP1/UAF1 komplex-el és ubikvitin-PCNA-vel. Azt figyeltük meg, hogy a vad típusú (WT) és a PIP pontmutáns Spartan gátolta a deubikvitilációt mind a

mono-ubikvitin-illetve poli-ubikvitin-PCNA-n, míg az UBZ illetve UBZ-PIP mutánsok nem gátolták (46. ábra).



46. ábra: A Spartan gátolja az USP1/UAF1 deubikvitiláló funkcióját az ubikvitin-PCNA-n.
A kísérletben tisztított USP1/UAF1 komplexet, UBZ, PIP illetve UBZ-PIP Spartant és mono-ubikvitin-illetve poliubikvitin-PCNA-t inkubáltunk. A kísérlet eredményét anti-PCNA Western blot analízissel ellenőriztük.

Az *in vitro* kísérletek eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan az ubikvitin-PCNA megkötésével akadályozza az USP1-függő PCNA deubikvitilációt.

VI. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Munkánk eredményeként azonosítottunk egy új DNS-hiba javításban szerepet játszó fehérjét, a C1orf124/Spartant. Kísérleteink során kimutattuk illetve karakaterizáltuk a Rad18 függő DNS-hiba tolerancia útvonalban betöltött szerepét.

A munkacsoportunkban az ubikvitin kötő domének szerepét vizsgáljuk a DNS-hiba javításban, abból a célból, hogy részletesebben megismerjük ezeknek a folyamatoknak a szabályozását. Ezért olyan fehérjék után kutatunk, amelyek rendelkeznek ubikvitin kötő doménnel. Az ismert DNS-hiba javításban szerepet játszó fehérjék doménszerkezetét megvizsgálva azt állapítottuk meg, hogy a Spartan hasonló C2HC típusú UBZ (Ubiquitin Binding Zinc Finger Domain) doménnal rendelkezik, mint a Rad18, Polk, Rap80 (FAAP20) vagy WRNIP1 emberi fehérjék (41,65,80,81). A fehérje C-terminális végén helyezkedik el a C2HC domén, amelyet a kísérletekben UBZ doménnek hívtunk. Erről feltételeztük, hogy az ubikvitin kötésben van szerepe. Az adatbázisok adatain felül azt találtuk, hogy a Spartan hordoz egy feltételezhető PIP, PCNA kötő motívumot is, amely megtalálható számos DNS-hiba javító fehérjében is (65,82). N-terminális felől tartalmaz egy SprT domént, amelybe egy jellegzetes HexxH motívum ágyazódik. Baktériumokban végzett kísérletek alapján ennek feltehetően metalloproteáz funkciója lehet, azonban emlős sejtekben funkciója nem ismert (68).

A domének funkcionális vizsgálatának céljából a rendelkezésre álló adatok alapján domén pontmutációkat állítottunk elő konzervált aminosavak cseréjével. Így az SprT doménben a 111 és 112-es, a PIP motívumban a 331 és 332-es, az UBZ doménben 459-es aminosavakat mutáltuk el.

A Spartan DNS-hiba javításban betöltött szerepéből következhet egy potenciális tumor szupresszor funkció is, hogy a Tumorscape Adatbázis adatai szerint a C1orf124 gén közeli kromoszóma régió deléciója esetén a rák különböző fajtái alakulhatnak ki magas számban. Ezt a megállapítás 3131 különböző tumor vizsgálatának eredményeként írták le (83).

Kísérleteinkkel párhuzamosan tanulmány jelent meg az SNM1A fehérjéről, amely az általunk vizsgált fehérjéhez hasonló C2HC típusú ubikvitin kötő domént és PIP domént tartalmaz. Kimutatták, hogy az SNM1A DNS szálak közötti keresztkötések feloldásában játszik szerepet nukleáz aktivitásának köszönhetően. Kimutatták, hogy PIP doménjével képes kötni a PCNA-t, UBZ doménnel pedig az ubikvitint, és lokalizációja függ ezektől a doménektől (65).

A DNS-hiba javító fehérjékre jellemző, hogy a DNS károsodás helyéhez lokalizálnak. A Spartan lézersugárral kezelt sejtekeben a DNS károsodás helyéhez mutat lokalizációt. A Spartan továbbá az aktív replikációs villához lokalizál, és kolokalizációt mutat a PCNA-vel. Kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a Spartan a DNS károsodás következtében megállt replikációs villához is képes lokalizálni hasonlóan a DNS-hiba javító fehérjékhez.

További lokalizációs kísérletekben azt figyeltük meg, hogy az UBZ és PIP Spartan mutánsok elveszítették lokalizációs képességüket a replikációs villához, ellentétben az SprT mutánssal. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan lokalizációjához szükségesek az UBZ és a PIP domének.

A Spartan a Rad18-hoz hasonló UBZ doménnel rendelkezik és a replikációs villához lokalizál. Ezért megvizsgáltuk kolokalizációs képességét a Rad18-al. A Spartan a Rad18 +/- HCT116 sejtekben elveszítette lokalizációs képességét, azonban a Rad18 menekített sejtekben helyreállt fókuszformáló képessége. A Spartan abban az esetben is elveszítette fókuszformáló képességét, amikor mellette ligáz funkcióval nem rendelkező Rad18 RING mutáns és ubikvitin kötő képességgel nem rendelkező Rad18 UBZ mutáns volt jelen.

Ezzel párhuzamosan *in vivo* koimmunoprecipitációs kísérletekben azt figyeltük meg, hogy a Spartan egy fehérje komplexben működik a Rad18-al. Ezeknek a kísérleteknek az eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan a Rad18 fehérjével szorosan együttműködve fejt ki hatását.

A Rad6-Rad18 ubikvitin konjugáló és ligáz enzim komplex monoubikvitilálja a PCNA-t DNS károsodás hatására. A monoubikvitin-PCNA-t további enzimek, mint Mms2-Ubc13 ubikvitin konjugáló, és HLTF ubikvitin ligáz enzimek poliubikvitilálják (50). Mivel Spartan feltételezhetően funkcionális PCNA (PIP) és ubikvitin (UBZ) kötő doméneket tartalmaz és Rad18-al komplexet képez, megvizsgáltuk, hogy lokalizációja hogyan változik a PCNA ubikvitilációjának gátlásával. Ennek során az MMS2, UBC13, HLTF és RAD18 gének csendesítésének hatását vizsgáltuk a Spartan lokalizációs képességére. A géncsengesítések mindegyikénél azt tapasztaltuk, hogy a Spartan elveszítette fókuszformáló képességét. A kísérletek eredményeiből így azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan lokalizációja az ubikvitin-PCNA-tól függ.

In vivo és *in vitro* kísérletekben a Spartan kölcsönhatást mutatott a mono- illetve a poliubikvitin-PCNA-vel, amely arra utal, hogy a Spartan az ubikvitin-PCNA kötésen keresztül fejt ki hatását.

A Rad18 csengesítése, illetve a PCNA ubikvitiláció hiánya a sejtek megnövekedett érzékenységét okozza DNS károsító ágensekkel szemben(72,73). Kísérletünkben a Spartan

hasonló érzékenységet mutatott, amely újabb bizonyíték, hogy a Spartan DNS-hiba javító fehérje.

Megvizsgálva a Spartan mutánsok érzékenységét, azt láttuk, hogy az UBZ, SprT és a PIP pontmutációja is fokozott érzékenységet mutatott. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy a Rad18 és a Spartan kettős csendesítése nem okozott nagyobb érzékenységet a sejtekben, mint a gének külön-külön csendesítése, tehát a Spartan és a Rad18 azonos DNS-hiba javító folyamatokban játszanak szerepet.

A Rad18 függő DNS-hiba tolerancia útvonal a megállt replikációs villa mentése érdekében gátolja a rekombináció túlműködését (74). Kimutatták, hogy a Rad18 csendesítése a sejtekben megnöveli a testvér kromatidák közötti átkereszteződések számát (75).

A Spartan csendesítése hasonlóan a Rad18 csendesítéséhez fokozott testvér kromatidák közötti kicserélődést okozott a sejtekben. Ez a kísérlet megerősítette, hogy a Spartan a Rad18 csoport egy tagja és szerepet játszik a genom stabilitásának megőrzésében.

Az ubikvitin-PCNA szabályozza a megakadt replikációs villánál a polimeráz váltást, ezzel a TLS szintézis elindulását (13,44,76,77). Mivel a Spartan köti az ubikvitin-PCNA-t, feltételeztük, hogy stimulálja a TLS-t. Ennek vizsgálatára a Pol η TLS polimerázt választottuk markerként, amely stabil expresszió esetén homogén eloszlást mutat a sejtmagban, UV kezelés hatására viszont a replikációs villához lokalizál(78,79). Az ubikvitilált PCNA félélet idejét képes szabályozni az USP1 fehérje (Ubiquitin-specific protease 1) együtt működve az UAF1 fehérjével (USP1-associated factor 1). Az USP1 az UAF1 fehérjével alkotott komplex katalitikus alegysége, amely képes deubikvitilálni a PCNA molekulát, ezáltal akadályozni a TLS-t(71). Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a Spartan kölcsönhatása az ubikvitin-PCNA-vel stimulálja a pol η lokalizációját a replikációs villához azáltal, hogy gátolja az USP1 PCNA deubikvitiláló hatását.

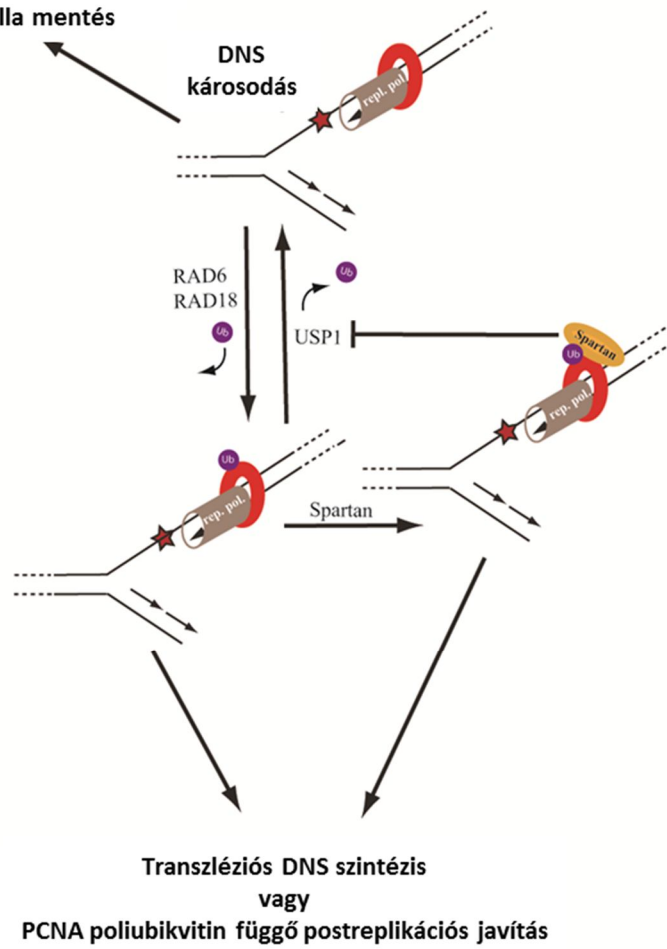
In vitro kísérletben megerősítettük a Spartan hatását az USP1 deubikvitiláló képességére. Kísérletünkben az USP1/UAF1 fehérje komplex mennyiségének növelésével nőtt a deubikvitiláció mértéke az ubikvitin-PCNA-n. A Spartan fehérje mennyiségének növelésével azonban csökkent a PCNA deubikvitilációja. Ennek oka, hogy egyre több Spartan volt képes kötni az adott mennyiségű ubikvitin-PCNA-hez, amelynek következtében egyre kevesebb ubikvitin-PCNA-t volt képes deubikvitilálni az USP1. A kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan mivel képes kötni az ubikvitin-PCNA-t, így nem engedi, hogy az USP1 deubikvitilálja a PCNA-t, következésképp indirekt módon képes stimulálni a pol η lokalizációját DNS károsodás hatására.

Eredményeink publikálása közben olyan tanulmányok jelentek meg, ahol megfigyeléseinket alátámasztva a Spartan DNS-hiba javításban betöltött szerepét bizonyítják (84,85). Ezekben a cikkekben bár leírják a Spartan ubikvitin-PCNA szabályozó szerepét, nem mutatják be kísérletesen, hogy ez az USP1 gátlásán keresztül megy végbe. Ennek következtében nem határozták meg a Spartan DNS-hiba javításban betöltött pontos funkcióját. Saját kísérleteink bizonyítják, hogy a Spartan csendesítésének következtében csökkent az ubikvitin-PCNA mennyisége a sejtekben, míg az USP1 csendesítésének következtében növekedett. Emellett azt is megfigyeltük, hogy az USP1 fokozott expressziója a sejtekben az ubikvitin-PCNA mennyiségének csökkenését okozta, ellentétben a Spartan expressziójának fokozásával. Az eredményt megerősítettük *in vitro* kísérletekkel is, ahol kimutattuk, hogy a Spartan közvetlen gátolja az USP1 deubikvitoláló hatását a PCNA-n. Ezen felül kimutattuk, hogy a Spartan csendesítése a Rad18-hoz hasonlóan fokozott testvér kromatidok közötti kicserölődést okozott, amelyből azt a következtetést vontuk le, hogy a Spartan a genom stabilitásának megőrzésében fontos szerepet tölt be. Emellett részleteiben vizsgáltuk a Spartan hatását a Pol η fókuszformáló képességére.

A kísérleti eredményeink összefoglalásaként a Spartan DNS-hiba javításban betöltött szerepére a következő modellt állítottuk fel.

A DNS károsodás következtében megállt replikációs villa helyénél a Rad6-Rad18 által szabályozott PCNA ubikvitoláció valamint az USP1 PCNA deubikvitoláció dinamikus folyamat. Mindkét folyamat szabályozza az ubikvitin-PCNA féléletidejét és a replikációs villa mentésének lehetőségét. Az ubikvitin-PCNA aktiválja a TLS-t és a templát váltás függő villamentést. Az ubikvitin-PCNA deubikvitolálásával azonban lehetőség nyílik a replikációs villa mentésére a rekombináció függő folyamat működésével, amely túlműködése azonban genomikus instabilitáshoz vezethet. A Spartan szabályozó szerepet tölt be az ubikvitin-PCNA féléletidejének szabályozásában, azáltal, hogy képes kötni az ubikvitin-PCNA-t, megvédve azt az USP1 deubikvitoláló hatásától. Így a Spartan közvetett módon stimulálja a TLS-t, illetve a templátváltás függő mechanizmust (47. ábra).

Rekombináció függő replikációs villa mentés



47. ábra: A Spartan funkciójának modellje a DNS-hiba tolerancia útvonalban.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során szekvencia adatbázisokban végzett doménszerkezet vizsgálat segítségével találtunk egy lehetséges új, DNS-hiba javításban szerepet játszó fehérjét, a C1orf124/Spartant, amely feltételezett C2HC típusú ubikvitin kötő doménnel rendelkezik. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy szerepet játszhat-e ez a gén a DNS-hiba javításban. A következő eredményeket értük el:

- Kimutattuk, hogy a Spartan a DNS károsodás következtében megállt replikációs villához lokalizál Rad18 függő módon.
- Megállapítottuk, hogy a Spartan lokalizációja a Rad18 függő PCNA ubikvitilációtól függ.
- Bizonyítottuk, hogy a Spartan funkciója illetve lokalizációja függ UBZ és PIP doménjeitől.
- A Spartan csendesített sejtekben megnövekedett érzékenységet mutattunk ki DNS károsító ágensek alkalmazása mellett. Az UBZ, SprT és PIP pontmutánsok esetében is fokozott érzékenységet mutattunk ki.
- Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy a Rad18 és a Spartan kettős csendesítése nem okozott nagyobb érzékenységet a sejtekben, mint a gének külön-külön csendesítése, tehát a Spartan és a Rad18 egy útvonalban játszanak szerepet.
- *In vitro* kísérletekben kimutattuk, hogy a Spartan a Rad18 fehérjével kölcsönhatásba lép.
- Megállapítottuk, hogy a Spartan kölcsönhat az ubikvitin konjugált PCNA-vel *in vivo* és *in vitro* körülmények között.
- Kimutattuk, hogy a Spartan PIP doménjén keresztül a PCNA-vel, UBZ doménjén keresztül kölcsönhat az ubikvitinnel.
- Feltártuk, hogy a PIP és UBZ domének szükségesek ahhoz, hogy az ubikvitin-PCNA megkötésével védje a Spartan az USP1 PCNA deubikvitiláló ezáltal TLS szintézist gátló hatását.
- Kimutattuk, hogy a Spartan szabályozza a pol η megállt replikációs villához történő lokalizációját.
- Spartant csendesített emberi sejtvonalakat létrehozva megállapítottuk, hogy a Spartan kontroll alatt tartja a testvér kormatidák közötti kicserélődést.

Összefoglalásként megállapítható, hogy sikerült azonosítanunk egy új DNS-hiba javító gént, a C1orf124/Spartant. Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a Rad6-Rad18 DNS-hiba tolerancia útvonalban játszik szerepet. Feltártuk, hogy a Spartan az ubikvitin-PCNA kötési képességével gátolja az USP1 deubikvitiláló enzim hatását, ami eredményeként képes stimulálni a transzléziós DNS-szintézist, és szerepet játszik a genom stabilitásának megőrzésében.

VIII. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

A sejtek örökítőanyagát folyamatosan érik külső és belső forrásból származó károsító hatások, amelyek javítása létfontosságú a sejtek életének szempontjából. A DNS károsodások következtében megállt replikációs villa akár DNS kettősszájú törések kialakulásához, genomikus instabilitáshoz, végeredményben a sejt halálához vezethet. Ennek elkerülése érdekében alakult ki az evolúció során a Rad6-Rad18 DNS-hiba tolerancia útvonal.

A Rad6-Rad18 ubikvitin konjugáló és ligáz enzim komplex képes monoubikvitilálni a PCNA-t. Monoubikvitiláció esetén a replikatív polimeráz lecserélődik egy úgynevezett alternatív polimerázra, amelynek aktív centruma képes befogadni a beépült hibás bázist. A DNS-hibán túlhaladva ismét visszacserélődik a replikatív polimeráz, és helyreáll a sejt normál replikációja. Ez a folyamat a transzléziós szintézis (TLS Translesion synthesis). A TLS folyamata DNS hibától függően több alútvonalra tagolódik, amelyek lehetnek hibamentesek vagy hibát generálók. Az UV-károsított DNS esetében például az egyik út a polimeráz éta (Pol η) aktiválásával hiba mentes, míg más utak, a polimeráz kappa (Pol κ), polimeráz iota (Pol ι) vagy a polimeráz zéta (Pol ζ) és Rev1 szerepjátszásával mutáció árán történő átírást biztosítanak. A Rad6-Rad18 mellett a HLTf fehérje is egy ubikvitin ligáz, amely az Ubc13-Mms2 ubikvitin konjugáló enzim komplex-szel együtt képes a már monoubikvitilált PCNA-re további ubikvitin molekulákat kapcsolni. A poliubikvitilált PCNA aktiválja a templát cserével történő javítást, többek között a replikációs villa megfordításával. A replikációs villa mentésének másik útvonala a rekombináció függő folyamat, azonban ennek túlműködése genomikus instabilitáshoz vezethet. Ezért a szigorú szabályozás elengedhetetlen a sejt genomikus stabilitásának megőrzése érdekében.

Az ubikvitilált PCNA féléletidejét képes szabályozni az USP1 fehérje (Ubiquitin-specific protease 1) együtt működve az UAF1 fehérjével (USP1-associated factor 1). Az USP1 az UAF1 fehérjével komplexet alkotva képes deubikvitilálni a PCNA molekulát, ezzel akadályozni a DNS-hiba tolerancia útvonal működését, utat engedve a rekombináció függő villamentésnek.

Munkánk során szekvencia adatbázisokban végzett doménszerkezet vizsgálat segítségével találtunk egy lehetséges új DNS-hiba javításban szerepet játszó emberi fehérjét, a C1orf124/Spartant, amely feltételezett C2HC típusú ubikvitin kötő doménnel (UBZ) rendelkezik. Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy szerepet játszhat-e ez a gén a DNS-hiba javításban.

Az adatbázisban található információk alapján a Spartan N-terminális felől hordoz egy SprT domént, amelybe jellegzetes HexxH motívum ágyazódik. Baktériumokban végzett kísérletek alapján ennek feltehetően metalloproteáz funkciója lehet, azonban emlős sejtekben funkciója nem ismert. A fehérje C-terminális végén helyezkedik el az UBZ domén, amelyről feltételeztük, hogy az ubikvitin kötésben van szerepe. A Tumorscape Adatbázis adatai szerint C1orf124/Spartan gén közeli kromoszóma régió deléciója esetén a rák különböző fajtái alakulhatnak ki magas számban, amelyet 3131 különböző tumor vizsgálatával határoztak meg. Ezeken kívül felfedeztünk egy PIP motívumot is, amely PCNA interakciós motívum, számos DNS-hiba javításban részt játszó fehérjében is megtalálható.

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a Spartan fehérjét, hogy lehetséges új szereplője-e a DNS-hiba tolerancia útvonalnak, illetve meghatározzuk pontos szerepét.

A kísérleteink során a következő eredményeket értük el:

- Kimutattuk, hogy a Spartan a DNS károsodás következtében megállt replikációs villához lokalizál Rad18 függő módon.
- Megállapítottuk, hogy a Spartan lokalizációja a Rad18 függő PCNA ubikvitilációtól függ.
- Bizonyítottuk, hogy a Spartan funkciója illetve lokalizációja függ UBZ és PIP doménjeitől.
- A Spartan csendesített sejtekben megnövekedett érzékenységet mutattunk ki DNS károsító ágensek alkalmazása mellett. Az UBZ, SprT és PIP pontmutások esetében is fokozott érzékenységet mutattunk ki.
- Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy a Rad18 és a Spartan kettős csendesítése nem okozott nagyobb érzékenységet a sejtekben, mint a gének külön-külön csendesítése, tehát a Spartan és a Rad18 egy útvonalban játszanak szerepet.
- *In vitro* kísérletekben kimutattuk, hogy a Spartan a Rad18 fehérjével kölcsönhatásba lép.
- Megállapítottuk, hogy a Spartan kölcsönhat az ubikvitin konjugált PCNA-vel *in vivo* és *in vitro* körülmények között.
- Kimutattuk, hogy a Spartan PIP doménjén keresztül a PCNA-vel, UBZ doménjén keresztül kölcsönhat az ubikvitinnel.

- Feltártuk, hogy a PIP és UBZ domének szükségesek ahhoz, hogy az ubikvitin-PCNA megkötésével védje a Spartan az USP1 PCNA deubikvitiláló ezáltal TLS szintézist gátló hatását.
- Kimutattuk, hogy a Spartan szabályozza a pol η megállt replikációs villához történő lokalizációját.
- A Spartan csendesített emberi sejtvonalakat létrehozva megállapítottuk, hogy a Spartan kontroll alatt tartja a testvér kormatidák közötti kicserélődést.

Eredményeinket összefoglalva bizonyítottuk, hogy az eddig ismeretlen C1or124/Spartan gén egy új Rad6-Rad18 csoportba tartozó DNS-hiba javító fehérje. Kísérleti eredményeink alapján a Spartan funkciójára a következő modellt állítottuk fel:

A DNS károsodás következtében megállt replikációs villa helyénél a Rad6-Rad18 által szabályozott PCNA ubikvitiláció valamint az USP1 PCNA deubikvitiláció dinamikus folyamat. Mindkét folyamat szabályozza az ubikvitin-PCNA féléletidejét és a replikációs villa mentésének lehetőségét. Az ubikvitin-PCNA aktiválja a TLS-t és a templát váltás függő villamentést. Az ubikvitin-PCNA deubikvitilálásával azonban lehetőség nyílik a replikációs villa mentésére a rekombináció függő folyamat működésével, amely túlműködése azonban genomikus instabilitáshoz vezethet. A Spartan szabályozó szerepet tölt be az ubikvitin-PCNA féléletidejének szabályozásában, azáltal, hogy képes kötni az ubikvitin-PCNA-t, megvédve azt az USP1 deubikvitiláló hatásától. Így a Spartan közvetett módon stimulálja a TLS-t, illetve a templátváltás függő mechanizmust.

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a Spartan fontos szerepet játszik a DNS-hiba tolerancia útvonalban, valamint a genom stabilitásának megőrzésében.

IX. SUMMARY OF THE PHD THESIS (ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ)

The genome is constantly under assault from chemical agents and radiation, which is especially deleterious in S-phase, when replication forks may stall upon encountering unrepaired DNA lesions leading to double-strand break formation and DNA rearrangements. The rescue of stalled replication forks is governed by the Rad6–Rad18 ubiquitin ligase complex-dependent monoubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the DNA polymerase processivity factor, that facilitates DNA polymerase Pol η , Pol ζ and Rev1 dependent translesion synthesis (TLS) providing direct nucleotide incorporation opposite DNA lesions. In addition, monoubiquitylated PCNA can be polyubiquitylated by Mms2-Ubc13 ubiquitin conjugating and HLTF ligase leading to template switching, in which copying from the undamaged newly synthesized sister strand can lead to error-free DNA damage bypass. In the absence of PCNA ubiquitylation, recombination using the sister chromatid can facilitate an alternative means for fork rescue. However, it has been suggested that reviving replication forks by recombination is disadvantageous for cells, probably because it can lead to gross chromosomal rearrangements.

Although the operation of the Rad6–Rad18-dependent damage bypass pathway is considered sufficient to suppress gross chromosomal rearrangements, untimely DNA synthesis by low-fidelity TLS polymerases could also lead to genome instability by increasing the rate of point mutations. Although PCNA ubiquitylation promotes the access of a TLS polymerase to the replication fork, PCNA deubiquitylation can initiate the displacement of a TLS polymerase and provide the restoration of the normal DNA synthesis by the high-fidelity polymerase after replication through the lesion. Moreover, PCNA deubiquitylation can inhibit the untimely access of low-fidelity TLS polymerases and other players to the replication fork. One level of the control of the lifetime of ubiquitylated- PCNA is provided by ubiquitin-specific protease 1 (USP1) existing in complex with the USP1-associated factor1 (UAF1) stimulatory subunit, which can deubiquitylate PCNA. USP1-dependent PCNA deubiquitylation is regulated, on one hand, by UV irradiation-dependent inactivation of USP1 through an autocleavage event and, on the other hand, by the PCNA-interacting ELG1 protein that is essential for recruiting USP1-UAF1 to the stalled fork. However, understanding the regulation of the dynamism of PCNA ubiquitylation and deubiquitylation and its consequences on protein recruitments to the stalled replication fork and on the choice of DNA damage tolerance (DDT) pathways are still in a rudimentary stage.

We now report the further characterization of human Spartan/C1orf124 and provide evidence for its regulatory role in DDT.

In sequence database we found that Spartan has a SprT domain which includes a HexxH motif and a C2HC UBZ (Ubiquitin Binding Zinc Finger) domain. In addition, we have also discovered a PIP-(PCNA Interacting Protein motif) motif which we characterised.

Our goals were to characterize Spartan, a previously unknown protein, and unraveled its role in the RAD18-dependent pathway of replication of damaged DNA.

In our studies we showed that

- Spartan localizes to sites of replication stress in a Rad18-dependent manner and also interacts with Rad18.
- Spartan also forms complex with ubiquitin modified PCNA *in vivo*.
- The siRNA silencing of Spartan sensitizes the cells against DNA damaging agents.
- The purified Spartan preferentially interacts with ubiquitin conjugated PCNA, which is facilitated by the PIP- and UBZ domains of Spartan.
- Spartan can stimulate the localization of pol η to stalled replication fork.
- The depletion of Spartan cause increased Sister Chromatide Exchange.
- Colocalization of Spartan with PCNA requires the UBZ and the PIP domains of Spartan.
- Binding of purified Spartan by its PIP- and UBZ domains to ubiquitin-conjugated PCNA provides protection against PCNA deubiquitylation by USP1.
- The reduction of monoubiquitin-PCNA level caused by Spartan knockdown could be reversed by simultaneous USP1 knockdown.
- Spartan overexpression can reverse the USP1 overexpression-dependent reduction of monoubiquitin-PCNA level.

Based on our findings we have built a model for the role of Spartan in DNA damage tolerance. We suggest that at the stalled replication fork, the Rad6-Rad18-dependent PCNA ubiquitylation and the USP1- dependent PCNA deubiquitylation are dynamic processes, of which balance determines the life-time of ubiquitin-PCNA and the choice of fork rescue mechanism. In the absence of ubiquitin-PCNA, replication fork can be rescued by recombination dependent mechanisms, which, however, have a potential for DNA rearrangements. In the presence of ubiquitin conjugated-PCNA, damage bypass or template switching can provide replication through the lesion without the formation of a DSB

intermediate. Spartan can provide one regulatory level by binding to ubiquitin-modified PCNA, which protects against PCNA deubiquitylation by USP1. Thus, Spartan can channel the reviving of stalled replication from a recombination-dependent pathway that does not require PCNA ubiquitylation to PCNA ubiquitylation-dependent translesion synthesis or PCNA polyubiquitylation-dependent template switching pathways.

We propose that by channeling fork rescue to damage bypass Spartan functions as a guardian during replication of damaged DNA. In fact, Spartan gene is significantly deleted in different tumors, implicating that Spartan might be paramount for cancer prevention in human cells. Undoubtedly, gaining more insight into the Spartan-dependent mechanisms will have important implications in understanding how deregulation of the DDT pathways can lead to chromosomal instability and cancer.

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, **Dr. Haracska Lajosnak**, hogy lehetővé tette csoportjában a PhD munkám végzését. **Balogh Dávidnak** köszönöm az *in vitro* kísérletek elkészítését. Köszönöm **Hajdú Ildikónak**, hogy elkészítette a microirradiation kísérletet, és **Burkovics Péternek**, hogy Spartan pontmutánsokat készített. Köszönöm **Mark A. Villamilnak** és **Zhiaho Zhuang-nak**, hogy rendelkezésünkre bocsátottak tisztított USP1/UAF1 komplexet. Köszönöm az **SZBK Genetikai Intézetnek**, hogy lehetőséget biztosított a PhD munkám végzéséhez. Köszönöm **Prof. Raskó Istvánnak** a támogatást és a hasznos tanácsokat.

Laboratóriumunk minden tagjának köszönöm a hasznos tanácsokat és ötleteket. **Illésné Kovács Katalinnak**, **Nótári Péternének** és **Fekete Ildikónak** a szakaszsztenciáért. Köszönöm **Daraba Andreea-nak** és **Hajdu Adriennek** az erőt, amelyet barátságukból meríthettem. Végezetül köszönöm **Édesanyukámnak**, hogy megteremtette a biztos hátteret és, hogy kitartásra ösztönzött.

XI. REFERENCIÁK

1. Friedberg, E.C. (2008) A brief history of the DNA repair field. *Cell Res*, **18**, 3-7.
2. Brooks, P.J. (1997) DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, **21**, 1073-1082.
3. Hansen, W.K. and Kelley, M.R. (2000) Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J Pharmacol Exp Ther*, **295**, 1-9.
4. Berwick, M. and Vineis, P. (2000) RESPONSE re: markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1537.
5. Patrick, S.M. and Turchi, J.J. (2002) Xeroderma pigmentosum complementation group A protein (XPA) modulates RPA-DNA interactions via enhanced complex stability and inhibition of strand separation activity. *J Biol Chem*, **277**, 16096-16101.
6. Matras, A. and Kohler, J. (1956) [A contribution on the Werner syndrome]. *Wien Med Wochenschr*, **106**, 437-441.
7. Kelner, A. (1949) Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated Escherichia Coli, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. *J Bacteriol*, **58**, 511-522.
8. Setlow, R.B. and Carrier, W.L. (1964) The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 226-231.
9. Boyce, R.P. and Howard-Flanders, P. (1964) Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in E. Coli K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 293-300.
10. Lu, A.L., Clark, S. and Modrich, P. (1983) Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 4639-4643.
11. Pettijohn, D. and Hanawalt, P. (1964) Evidence for Repair-Replication of Ultraviolet Damaged DNA in Bacteria. *J Mol Biol*, **9**, 395-410.
12. Friedberg, E.C. (2003) DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
13. Karkas, J.D. and Chargaff, E. (1966) Template functions in the enzymic formation of polyribonucleotides, I. Integrity of the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **56**, 664-671.
14. Kondakova, N.V., Levitman, M. and Tselikova, S.V. (1976) [Different protection of DNA against various types of damage]. *Radiobiologiya*, **16**, 100-103.
15. Berquist, B.R. and Wilson, D.M., 3rd. (2012) Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett*.
16. Cuozzo, C., Porcellini, A., Angrisano, T., Morano, A., Lee, B., Di Pardo, A., Messina, S., Iuliano, R., Fusco, A., Santillo, M.R. *et al.* (2007) DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation. *PLoS Genet*, **3**, e110.
17. Thiagarajan, V., Byrdin, M., Eker, A.P., Muller, P. and Brettel, K. (2011) Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 9402-9407.
18. Kondo, S. (1977) A test for mutation theory of cancer: carcinogenesis by misrepair of DNA damaged by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Br J Cancer*, **35**, 595-601.
19. Rupert, C.S. (1962) Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I. Kinetics of the reaction. *J Gen Physiol*, **45**, 703-724.
20. Zharkov, D.O. (2008) Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1544-1565.
21. de Boer, J. and Hoeijmakers, J.H. (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, **21**, 453-460.
22. Hombauer, H., Srivatsan, A., Putnam, C.D. and Kolodner, R.D. (2011) Mismatch repair, but not heteroduplex rejection, is temporally coupled to DNA replication. *Science*, **334**, 1713-1716.

23. Shrivastav, M., De Haro, L.P. and Nickoloff, J.A. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, **18**, 134-147.
24. Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y. and Wu, X. (2008) Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J Biol Chem*, **283**, 7713-7720.
25. Li, M.L. and Greenberg, R.A. (2012) Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. *Trends Biochem Sci*.
26. Sung, P. and Klein, H. (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 739-750.
27. Karpenshif, Y. and Bernstein, K.A. (2012) From yeast to mammals: Recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*.
28. Lobrich, M. and Jeggo, P.A. (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer*, **7**, 861-869.
29. Downs, J.A., Nussenzweig, M.C. and Nussenzweig, A. (2007) Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature*, **447**, 951-958.
30. Wang, L.C. and Gautier, J. (2010) The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **45**, 424-439.
31. Kim, H. and D'Andrea, A.D. (2012) Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev*, **26**, 1393-1408.
32. Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, **40**, 179-204.
33. Prakash, L. (1981) Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol Gen Genet*, **184**, 471-478.
34. Shiomi, N., Mori, M., Tsuji, H., Imai, T., Inoue, H., Tateishi, S., Yamaizumi, M. and Shiomi, T. (2007) Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res*, **35**, e9.
35. Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S. and Prakash, L. (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem*, **272**, 23360-23365.
36. Mozzherin, D.J., Tan, C.K., Downey, K.M. and Fisher, P.A. (1999) Architecture of the active DNA polymerase delta.proliferating cell nuclear antigen.template-primer complex. *J Biol Chem*, **274**, 19862-19867.
37. Lee, K.Y. and Myung, K. (2008) PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cells*, **26**, 5-11.
38. Moldovan, G.L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, **129**, 665-679.
39. Frampton, J., Irmisch, A., Green, C.M., Neiss, A., Trickey, M., Ulrich, H.D., Furuya, K., Watts, F.Z., Carr, A.M. and Lehmann, A.R. (2006) Postreplication repair and PCNA modification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **17**, 2976-2985.
40. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-141.
41. Masuda, Y., Suzuki, M., Kawai, H., Suzuki, F. and Kamiya, K. (2012) Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. *Nucleic Acids Res*, **40**, 1065-1076.
42. Notenboom, V., Hibbert, R.G., van Rossum-Fikkert, S.E., Olsen, J.V., Mann, M. and Sixma, T.K. (2007) Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5819-5830.

43. Miyase, S., Tateishi, S., Watanabe, K., Tomita, K., Suzuki, K., Inoue, H. and Yamaizumi, M. (2005) Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination. *J Biol Chem*, **280**, 515-524.
44. Zhuang, Z., Johnson, R.E., Haracska, L., Prakash, L., Prakash, S. and Benkovic, S.J. (2008) Regulation of polymerase exchange between Pol ϵ and Pol δ by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5361-5366.
45. Tissier, A., Kannouche, P., Reck, M.P., Lehmann, A.R., Fuchs, R.P. and Cordonnier, A. (2004) Co-localization in replication foci and interaction of human Y-family members, DNA polymerase pol ϵ and REV1 protein. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1503-1514.
46. Acharya, N., Haracska, L., Prakash, S. and Prakash, L. (2007) Complex formation of yeast Rev1 with DNA polymerase ϵ . *Mol Cell Biol*, **27**, 8401-8408.
47. Waters, L.S., Minesinger, B.K., Wiltrot, M.E., D'Souza, S., Woodruff, R.V. and Walker, G.C. (2009) Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev*, **73**, 134-154.
48. Prakash, S., Johnson, R.E. and Prakash, L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, **74**, 317-353.
49. Prakash, S. and Prakash, L. (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev*, **16**, 1872-1883.
50. Unk, I., Hajdu, I., Fattyol, K., Hurwitz, J., Yoon, J.H., Prakash, L., Prakash, S. and Haracska, L. (2008) Human HLTF functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3768-3773.
51. Blastyak, A., Pinter, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S. and Haracska, L. (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell*, **28**, 167-175.
52. Lee, K.Y., Yang, K., Cohn, M.A., Sikdar, N., D'Andrea, A.D. and Myung, K. (2010) Human ELG1 regulates the level of ubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) through its interactions with PCNA and USP1. *J Biol Chem*, **285**, 10362-10369.
53. Cotto-Rios, X.M., Jones, M.J., Busino, L., Pagano, M. and Huang, T.T. (2011) APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *J Cell Biol*, **194**, 177-186.
54. Nijman, S.M., Huang, T.T., Dirac, A.M., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D. and Bernards, R. (2005) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, **17**, 331-339.
55. Fox, J.T., Lee, K.Y. and Myung, K. (2011) Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/deubiquitylation. *FEBS Lett*, **585**, 2780-2785.
56. Wrighton, K.H. (2011) Mechanisms of disease: USP1 keeps ID proteins stable. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 691.
57. Garcia-Santisteban, I., Zorroza, K. and Rodriguez, J.A. (2012) Two nuclear localization signals in USP1 mediate nuclear import of the USP1/UAF1 complex. *PLoS One*, **7**, e38570.
58. Ulrich, H.D. (2006) Deubiquitinating PCNA: a downside to DNA damage tolerance. *Nat Cell Biol*, **8**, 303-305.
59. Dianov, G.L., Meisenberg, C. and Parsons, J.L. (2011) Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Biochemistry (Mosc)*, **76**, 69-79.
60. Huang, T.T. and D'Andrea, A.D. (2006) Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 323-334.

61. Brun, J., Chiu, R.K., Wouters, B.G. and Gray, D.A. (2010) Regulation of PCNA polyubiquitination in human cells. *BMC Res Notes*, **3**, 85.
62. Wang, B., Alam, S.L., Meyer, H.H., Payne, M., Stemmler, T.L., Davis, D.R. and Sundquist, W.I. (2003) Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4. *J Biol Chem*, **278**, 20225-20234.
63. Hurley, J.H., Lee, S. and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*, **399**, 361-372.
64. Sengerova, B., Allerston, C.K., Abu, M., Lee, S.Y., Hartley, J., Kiakos, K., Schofield, C.J., Hartley, J.A., Gileadi, O. and McHugh, P.J. (2012) Characterization of the Human SNM1A and SNM1B/Apollo DNA Repair Exonucleases. *J Biol Chem*, **287**, 26254-26267.
65. Yang, K., Moldovan, G.L. and D'Andrea, A.D. (2010) RAD18-dependent recruitment of SNM1A to DNA repair complexes by a ubiquitin-binding zinc finger. *J Biol Chem*, **285**, 19085-19091.
66. Kaufman, C.D., Izsvak, Z., Katzer, A. and Ivics, Z. (2005) Frog Prince transposon-based RNAi vectors mediate efficient gene knockdown in human cells. *J RNAi Gene Silencing*, **1**, 97-104.
67. German, J. and Alhadeff, B. (2001) Analysis of sister-chromatid exchanges. *Curr Protoc Hum Genet*, **Chapter 8**, Unit 8 6.
68. McGwire, B.S. and Chang, K.P. (1996) Posttranslational regulation of a Leishmania HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic, zinc binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit. *J Biol Chem*, **271**, 7903-7909.
69. Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M. *et al.* (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, **463**, 899-905.
70. Watanabe, K., Tateishi, S., Kawasuji, M., Tsurimoto, T., Inoue, H. and Yamaizumi, M. (2004) Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J*, **23**, 3886-3896.
71. Brown, S., Niimi, A. and Lehmann, A.R. (2009) Ubiquitination and deubiquitination of PCNA in response to stalling of the replication fork. *Cell Cycle*, **8**, 689-692.
72. Tateishi, S., Sakuraba, Y., Masuyama, S., Inoue, H. and Yamaizumi, M. (2000) Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7927-7932.
73. Tateishi, S., Niwa, H., Miyazaki, J., Fujimoto, S., Inoue, H. and Yamaizumi, M. (2003) Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in RAD18 knockout mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **23**, 474-481.
74. Hohegger, H., Sonoda, E. and Takeda, S. (2004) Post-replication repair in DT40 cells: translesion polymerases versus recombinases. *Bioessays*, **26**, 151-158.
75. Yamashita, Y.M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G.Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M. and Takeda, S. (2002) RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J*, **21**, 5558-5566.
76. Kannouche, P., Fernandez de Henestrosa, A.R., Coull, B., Vidal, A.E., Gray, C., Zicha, D., Woodgate, R. and Lehmann, A.R. (2002) Localization of DNA polymerases eta and iota to the replication machinery is tightly co-ordinated in human cells. *EMBO J*, **21**, 6246-6256.

77. Acharya, N., Brahma, A., Haracska, L., Prakash, L. and Prakash, S. (2007) Mutations in the ubiquitin binding UBZ motif of DNA polymerase eta do not impair its function in translesion synthesis during replication. *Mol Cell Biol*, **27**, 7266-7272.
78. Acharya, N., Yoon, J.H., Hurwitz, J., Prakash, L. and Prakash, S. (2010) DNA polymerase eta lacking the ubiquitin-binding domain promotes replicative lesion bypass in humans cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 10401-10405.
79. Kannouche, P., Broughton, B.C., Volker, M., Hanaoka, F., Mullenders, L.H. and Lehmann, A.R. (2001) Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev*, **15**, 158-172.
80. Crosetto, N., Bienko, M., Hibbert, R.G., Perica, T., Ambrogio, C., Kensche, T., Hofmann, K., Sixma, T.K. and Dikic, I. (2008) Human Wrip1 is localized in replication factories in a ubiquitin-binding zinc finger-dependent manner. *J Biol Chem*, **283**, 35173-35185.
81. Ali, A.M., Pradhan, A., Singh, T.R., Du, C., Li, J., Wahengbam, K., Grassman, E., Auerbach, A.D., Pang, Q. and Meetei, A.R. (2012) FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway. *Blood*, **119**, 3285-3294.
82. Bienko, M., Green, C.M., Sabbioneda, S., Crosetto, N., Matic, I., Hibbert, R.G., Begovic, T., Niimi, A., Mann, M., Lehmann, A.R. *et al.* (2010) Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination. *Mol Cell*, **37**, 396-407.
83. Rousseau-Merck, M.F., Koczan, D., Legrand, I., Moller, S., Autran, S. and Thiesen, H.J. (2002) The KOX zinc finger genes: genome wide mapping of 368 ZNF PAC clones with zinc finger gene clusters predominantly in 23 chromosomal loci are confirmed by human sequences annotated in Ensembl. *Cytogenet Genome Res*, **98**, 147-153.
84. Machida, Y., Kim, M.S. and Machida, Y.J. (2012) Spartan/C1orf124 is important to prevent UV-induced mutagenesis. *Cell Cycle*, **11**.
85. Centore, R.C., Yazinski, S.A., Tse, A. and Zou, L. (2012) Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response. *Mol Cell*, **46**, 625-635.